

Universidad Autónoma de Madrid



Programa de doctorado en Biociencias Moleculares

Tesis Doctoral

**Mecanismos y factores implicados en la
plasticidad de la cadena de transporte
electrónico mitocondrial**

Adela María Guarás Rubio

Madrid, 2017

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**Mecanismos y factores implicados en la
plasticidad de la cadena de transporte
electrónico mitocondrial.**

Memoria presentada por
Adela María Guarás Rubio
Licenciada en Bioquímica
Para optar al Grado Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid

Madrid, 2017

Director de Tesis
José Antonio Enríquez Domínguez
Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC)

D. JOSÉ ANTONIO ENRIQUEZ DOMINGUEZ, coordinador del área de Fisiopatología del miocardio, en el Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC)

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral **“Mecanismos y factores implicados en la plasticidad de la cadena de transporte electrónico mitocondrial”** ha sido realizada en el Área de Fisiopatología del miocardio en el Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, bajo su dirección y tutela y que reúne, a su juicio, las condiciones para optar al grado Doctor.

Madrid, Junio 2017

Fdo: José Antonio Enríquez

A Leandro

Agradecimientos

Escribir una tesis doctoral te da la maravillosa oportunidad de poder agradecer por escrito a las personas que te acompañaron en los años de trabajo. Podría decirse que los folios que siguen a este apartado son, en realidad, la excusa para expresar aquí todo lo que se debe a las personas que estuvieron ahí mientras eso tuvo lugar. Durante estos años todas las emociones han sido intensas, en tantos sentidos... Eso hizo, que las personas que me rodearon, hayan dejado en mí una huella imborrable.

En todo este tiempo he vivido muchos grupos en el mismo grupo, con tanto ir y venir de gente; pero todos tuvieron en común que me hicieron sentir como en casa. Por eso no puedo dejar de agradecer a todos mis compañeros y a mi director de tesis.

Gracias Toño, por darme esta oportunidad. Gracias por no juzgar mis limitaciones, sino ayudarme siempre a superarlas con un pequeño empujón.

Gracias Ester, por enseñarme los primeros meses con tanto rigor y detalle. Un ejemplo de cómo se debe hacer ciencia.

Gracias a todas las compañeras de Zaragoza, a Aciselo y a Patricio, por todo lo que aprendí de ellos cuando hacíamos seminarios conjuntos y por todo el bagaje que de muchas maneras dejaron en el grupo, y que aún hoy nos es tan útil.

Gracias a aquellos con los que compartí los inicios. Gracias Carmen, Conchi y Marta, por tener siempre una sonrisa y una palabra de apoyo. Gracias Edu por los mil debates sociopolíticos y científicos. Ya parecen prehistoria aquellas tardes; Ricardo, tú y yo discutiendo de ciencia, proponiendo ideas, entusiasmados por aprender y compartir.

Gracias a todos los *postdoc* que han pasado por el grupo. A Rebeca, por aportar su experiencia, a Tanja por su calidez, a Umut por su espléndida sonrisa, a Sergio por las animadas charlas, a Cristiane por sus locuras y a Sara por encontrar siempre el momento para detenerse a observar, escuchar y conversar de lo que realmente importa, aunque el mundo siga girando ahí fuera.

Gracias Carol, Isa, Ana Victoria, Mar y Elena, porque hicisteis todo más llevadero con vuestra compañía y vuestra frescura. Gracias por aguantar mis rollos y por hacer equipo. Todo es más fácil cuando puedes compartir los días, sean buenos o malos, con personas con un corazón tan grande.

Gracias Andrés, Clara y Raquel, por ser tan buenos compañeros y estar siempre dispuestos a ayudar.

Gracias a los estudiantes, porque no hay nada que me guste más de este trabajo que recibirlos a ellos. Todos adorables por un motivo u otro. Y todos me hicieron reír tanto. Son muchos los que hemos recibido; pero quisiera recordar aquí a Cristina, Blanca, Laura, María, Álvaro, Carol, Dani, Ester y Yolanda. Gracias por los buenos ratos y por vuestro gran sentido del humor.

Quisiera también agradecer a mi segundo grupo, el de proteómica, que tanto me ha aportado. Gracias Jesús, Enrique, Marta, Fernando y Estefanía por vuestro entusiasmo y gran implicación en los proyectos compartidos.

Necesarios para algunas de las conclusiones de estas tesis, han sido los experimentos realizados en el laboratorio del Dr. Plácido Navas. Quisiera agradecer a Plácido, María Ángeles y Ana, por su disposición y amabilidad.

Gracias a los compañeros de otras áreas, con los que he compartido el día a día. A los compañeros de los primeros grupos con los que compartimos sala y aquellos primeros seminarios de área, y a algunos que llegaron después. Quisiera nombrar aquí a Mary, Jesús, Michel, Marina, Mapi, Vane, Isa, Cristina y Nieves.

Hay algunos compañeros, con los que formalmente no he compartido proyectos, pero a los que quisiera dedicar unas líneas por haber sido apoyo constante y necesario, en lo moral y en lo práctico, para que esta tesis se haya llevado a cabo.

Gracias Ricardo, el mejor compañero de trabajo que se puede tener. La única persona que he conocido para la que el proyecto de cualquier compañero ocupaba en su cabeza el mismo espacio que el suyo propio. Siempre dispuesto a ayudar, y siempre entre carcajadas. Altruismo y creatividad.

Gracias Rocío. Qué hubiera sido de mí sin ti en estos últimos años... Gracias por estar tan pendiente, por tu ayuda incondicional, a mí y a tantos otros, y por esa dulzura que guardas dentro. Te deseo una larga carrera, porque el que vale, vale. Y tú vales muchísimo.

Gracias Ana. Gracias por estar siempre ahí, por tu escucha, por tu compañía y por el día a día. Porque en algunos sentidos hemos crecido juntas. Gracias por esa risa casi infantil capaz de hacer a cualquiera reconciliarse con el mundo. Tienes un enorme talento y una fuente inagotable de ilusión. Lo que sea que te propongas sólo puede salir bien. Una suerte inmensa haberte tenido como compañera. Una suerte mayor tenerte como amiga.

Gracias Ileana. ¡Buff! Esto no hay quien lo resuma, quizá si un día escribo un libro... Quién me iba a decir a mí, que mi gemela mental había nacido en una isla del Caribe. Gracias por todo lo compartido, que fue todo; por eso que sólo tú y yo parecemos ver. Mi paso por el CNIC ha merecido la pena, aunque sólo sea por haberlo vivido contigo y llevarme tu amistad.

En el ámbito personal, quisiera agradecer a mis padres su esfuerzo constante para que pudiera hacer lo que consideraron lo mejor para mí y que acabó siendo mi principal propósito en la vida: aprender. A mi padre, por educarme en la formación de mi propio criterio y por inculcarme la importancia del conocimiento para el desarrollo de la mente y el espíritu. A mi madre, por creer tanto en mí y por su eterna escucha.

Por último, quisiera dedicar esta tesis a la persona gracias a la cual consigo comenzar y finalizar los proyectos que me propongo. A ese ser especial y único que es mi marido. Cualquier palabra se queda corta para expresarme cuando se trata de ti. La ciencia nunca podrá explicar por qué al tomarnos de la mano, el tiempo se detiene, la gravedad disminuye, los planetas se alinean...

Resumen

La existencia de los supercomplejos respiratorios es un hecho ampliamente aceptado por la comunidad científica desde hace tan solo unos pocos años. En la actualidad, el debate se centra en si estas estructuras poseen o no verdadera relevancia funcional. Entre las funciones atribuidas a los supercomplejos respiratorios, se encuentra la capacidad de estabilizar complejos individuales, especialmente el complejo I. Sin embargo, una visión más compleja de la organización de este sistema supone atribuirle una naturaleza dinámica. Esta es la hipótesis postulada por el “modelo plástico”, que plantea que la cadena de transporte electrónico sería capaz de adaptar su organización y actividad a estímulos metabólicos, confiriendo por tanto a la asociación y disociación de supercomplejos un rol esencial en la regulación del metabolismo.

La adaptación estructural de la cadena de transporte al cambio en la ratio NADH/FADH₂ por cambio en la proporción de los tipos de sustrato aportados, fue previamente descrita. Este fenómeno, implica disminución en los niveles de complejo I para una reconfiguración de la cadena que permita la optimización de la entrada de electrones desde NADH o FADH₂, según sea la proporción de éstos. En este trabajo de tesis ha sido descrito el mecanismo que media este proceso. Dicho mecanismo, que implica la generación de transporte reverso de electrones a complejo I por incremento en el estado reducido de la coenzima Q, genera daño oxidativo en el complejo I que produce su degradación. Este fenómeno es también responsable de la degradación de complejo I en células carentes de complejo III, citocromo c y complejo IV. La carencia de complejo I en estos modelos se consideraba, hasta ahora, una evidencia de la dependencia estructural de CI por la presencia del resto de componentes de la cadena. La descripción de este mecanismo permite descartar esta hipótesis y afirmar que es la sobreredución de coenzima Q debida al fallo en la cadena, la causa de desestabilización de CI en ausencia de CIII, citocromo c o complejo IV.

Por otro lado, el estudio de la plasticidad de la cadena de transporte mitocondrial implica la búsqueda de factores de ensamblaje o proteínas reguladoras de función de supercomplejos respiratorios. La caracterización de este tipo de factores permitiría, además de aumentar el conocimiento sobre el modo en que la cadena se reorganiza, modular la asociación y función de supercomplejos para el análisis de su relevancia funcional.

En este trabajo, el análisis por espectrometría de masas de geles nativos, usualmente utilizados para la resolución de complejos y supercomplejos respiratorios, permitió identificar el perfil de migración en gel de cada proteína mitocondrial. Estudios posteriores de correlación entre perfiles de migración de cada proteína identificada y de cada complejo respiratorio, permitieron obtener proteínas candidatas de interacción con complejo I. El mejor de esos candidatos, la proteína EXTL1, fue analizada para su validación. Experimentos preliminares parecen sugerir la existencia de una isoforma mitocondrial de EXTL1, de menor tamaño y con probable actividad glicosiltransferasa.

En resumen, el trabajo contenido en esta tesis doctoral, aporta evidencias a favor de la naturaleza dinámica de la cadena de transporte electrónico.

Summary

The existence of respiratory supercomplexes has been accepted by the scientific community only few years ago. Nowadays, the debate focuses on whether these structures have a real functional relevance. The ability to stabilize individual complexes is one of the functions attributed to respiratory supercomplexes, especially in the case of complex I. However, a more complex view of the organization of this system assumes a dynamic nature. This is the hypothesis postulated by the "plastic model", which proposes that the electronic transport chain would be able to adapt its organization and activity to metabolic stimuli. This idea confers to the association and dissociation of supercomplexes an essential role in the regulation of metabolism.

The adaptation of the transport chain to different ratio NADH / FADH₂ in response to changes in the substrates provided by oxidation was previously described. This phenomenon involves a decrease in the levels of complex I, causing a reconfiguration of the chain. This remodeling allows the optimization of the electron entry from NADH or FADH₂ according to their ratio.

The mechanism that mediates this process is described in this study. This mechanism, which involves the generation of reverse electron transport to complex I by the increase in the reduced state of coenzyme Q, produces oxidative damage in complex I that triggers its degradation. This phenomenon is also responsible for the degradation of complex I in cells lacking complex III, cytochrome c and complex IV. So far, the lack of complex I in these models has been considered an evidence that complex I stability is dependent on the presence of the other electron chain components. The description of this mechanism allows to discard this hypothesis and to affirm that the over reduction of coenzyme Q is the cause of complex I destabilization in the absence of complex III, cytochrome c or complex IV.

On the other hand, the study of the mitochondrial transport chain plasticity involves the search for assembly factors or proteins regulating the function of respiratory supercomplexes. The characterization of this kind of factors would deepen our knowledge about supercomplexes physiology and would allow us to modulate the supercomplexes association and function.

Mass spectrometry analysis of native gels, usually performed for the resolution of respiratory complexes and supercomplexes, allowed the identification of each mitochondrial protein gel migration profile. Subsequent correlation studies between the migration profiles of each identified protein and each respiratory complex identified complex I interacting candidate proteins. EXTL1 protein, the most solid candidate, was analyzed for validation. Preliminary experiments suggest the existence of a mitochondrial isoform of EXTL1 with likely glycosyltransferase activity.

The conclusions of this thesis provide evidence in favour of the dynamic nature of the electronic transport chain.

Índice

Agradecimientos.....	9
Resumen.....	13
Summary.....	17
Índice.....	21
Abreviaturas.....	27
Introducción.....	33
I. Sistema OXPHOS: contexto celular.....	35
II. Sistema OXPHOS: estructura y actividad.....	37
II.1. Componentes y mecanismo.....	37
II.2. Producción de especies reactivas de oxígeno.....	38
III. Sistema OXPHOS: organización.....	42
III.1. Modelos de organización del sistema OXPHOS.....	42
III.2. Supercomplejos respiratorios.....	44
III.2.1. Estructura y asociaciones de complejos respiratorios.....	44
III.2.2. Ensamblaje de supercomplejos.....	47
III.3. Implicaciones funcionales de la organización en supercomplejos.....	50
III.3.1. Funciones atribuidas a los supercomplejos respiratorios.....	50
III.3.2. Plasticidad de la cadena de transporte electrónico.....	53
Objetivos.....	57
Materiales y métodos.....	61
I. Cultivos Celulares.....	63
I.1. Líneas celulares.....	63
I.2. Medios de cultivo.....	64
I.3. Condiciones de cultivo.....	64
I.4. Curvas de crecimiento.....	64
I.5. Generación de líneas con sobreexpresión de proteína de interés.....	65
II. Modelos animales.....	66
III. Biología molecular.....	66
III.1. Diseño de secuencias.....	66
III.2. Clonación de plásmidos en bacterias.....	67
III.3. Digestión de plásmidos.....	67
III.4. Electroforesis y extracción de DNA.....	67
III.5. Ligación de insertos en un nuevo plásmido.....	68
III.6. Conservación de colonias.....	68
IV. Extracción y resolución de muestras proteicas.....	68
IV.1 Extracción de proteínas.....	68
IV.2 Cuantificación de proteínas.....	68

IV.3. Síntesis de proteínas <i>in vivo</i> .	69
IV.4. Síntesis de proteínas <i>in vitro</i> .	69
IV.5. Electroforesis.	70
IV.5.1. Electroforesis en condiciones nativas Blue native-PAGE.	70
IV.5.2. Electroforesis SDS-PAGE para resolución en segunda dimensión de BN-PAGE.	72
IV.5.3. Electroforesis SDS-PAGE.	73
IV.5.4. Revelado de proteínas.	73
IV.5.4.1. Western blot.	74
IV.5.4.2. Tinción.	76
IV.5.4.3. Revelado de marcaje radioactivo.	76
V. Aislamiento de mitocondrias.	76
V.1. Aislamiento de mitocondrias de cultivos celulares.	76
V.2. Aislamiento de mitocondrias de tejidos.	77
V.3. Aislamiento de mitocondrias y tratamiento con proteinasa K.	77
V.4. Aislamiento de mitocondrias para medida de CoQH ₂ /CoQ.	77
VI. Medidas de función mitocondrial.	78
VI.1. Medidas de consumo de oxígeno.	78
VI.1.1. Medida con electrodo tipo Clark en células permeabilizadas.	78
VI.1.2. Medida en analizador Seahorse XF96 en células intactas.	78
VI.2. Determinación de CoQH ₂ /CoQ.	79
VI.3. Medida de actividad de complejos respiratorios.	79
VI.3.1 Medida de actividad en gel.	79
VI.2. Medida de actividad enzimática por espectrofotometría.	79
VI.2.1. Actividad NADH deshidrogenasa sensible a rotenona (complejo I).	80
VI.2.2. Actividad succinato deshidrogenasa (complejo II).	80
VI.2.3. Actividad citrato sintasa.	80
VI.4. Determinación de peróxido de hidrógeno.	81
VI.5. Importe a mitocondria de proteínas sintetizadas <i>in vitro</i> .	81
VII. Microscopía.	81
VIII. Inmunocaptura.	81
IX. Real time PCR.	82
IX.1. Ensayo de cuantificación absoluta.	82
IX.2. Ensayo de cuantificación relativa.	83
X. Técnicas proteómicas.	83
X.1. <i>Data Independent Scanning</i> (DiS).	83
X.2. Análisis cuantitativo de proteínas mitocondriales.	84
X.3. Análisis del estado de oxidación de cisteínas.	84
X.4. Análisis de correlación.	85
XI. Secuencias codificantes.	85
XII. Plásmidos.	89

Resultados	93
I. Estudio del mecanismo responsable de la optimización de la entrada de electrones a la cadena de transporte.	97
I.1. Modelos celulares.	97
I.1.1 Caracterización del efecto de la expresión de la oxidasa alternativa (AOX) de <i>Emericella nidulans</i> en células de ratón deficientes en citocromo c.	99
I.2. Estudio del mecanismo responsable de la degradación de CI en células Cytb ^{KO} , Cox10 ^{KO} y Cyt c ^{KO}	101
I.2.1. Evaluación del importe de proteínas por vía MIA40 en ausencia de CIII, Cyt c y CIV....	102
I.2.2. Evaluación del estado redox de la CoQ en células carentes de CIII, Cyt c y CIV y efecto de la expresión de AOX.	103
I.2.3. Evaluación de la interacción entre CoQH ₂ y CI, como fenómeno implicado en el mecanismo de degradación.....	104
I.2.3. Evaluación de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) vía transporte reverso de electrones (RET) como fenómeno implicado en el mecanismo de degradación.....	105
I.2.4. Caracterización del proceso de degradación de CI en células carentes de CIV a nivel proteico.	108
I.2.5. Evaluación de daño oxidativo a CI como fenómeno implicado en el mecanismo de degradación.....	110
I.2.6. Mecanismo responsable de la desestabilización de CI en células carentes de CIII (Cytb ^{KO}), Cyt c (Cyt c ^{KO}) o CIV (Cox10 ^{KO}).....	113
I.3. Reproducibilidad del mecanismo responsable de la degradación de CI en contextos fisiológicos.	114
I.3.1. Evaluación de la reproducibilidad de degradación de CI debida a bloqueo del flujo electrónico en células control.	114
I.3.2. Evaluación de la reproducibilidad de la degradación de CI en respuesta a cambio de sustrato en líneas celulares.	115
I.3.3. Evaluación de la implicación de la ratio CoQH ₂ /CoQ y producción de ROS vía RET en el fenómeno de degradación de CI en contextos fisiológicos.	116
I.4. Caracterización del efecto del difenileno iodonium (DPI) sobre la estabilidad de CI.	119
II. Búsqueda de factores implicados en la regulación estructural y funcional de los supercomplejos respiratorios.	127
II.1. Estudio del perfil de migración proteico en electroforesis en condiciones nativas, BN-PAGE.	128
II.2. Evaluación de la interacción de la proteína EXTL1 con complejos respiratorios. ...	131
Discusión	141
I. Discusión general.	143
II. Discusión: estudio del mecanismo responsable de la optimización de la entrada de electrones a la cadena de transporte.	145
III. Discusión: búsqueda de factores implicados en la regulación estructural y funcional de los supercomplejos respiratorios.....	149
Conclusiones	153

Bibliografía	157
Publicaciones	181

Abreviaturas

Å	Armstrong
ANT:	Transportador de nucleótidos de adenina
AOX:	Oxidasa alternativa
APS:	Persulfato amónico
ATP:	Adenosín trifosfato
Aas:	Aminoácidos.
BSA:	Seroalbúmina bovina
BCOADHC:	Complejo deshidrogenasa de α -cetoácidos de cadena ramificada
CI:	Complejo I mitocondrial
CII:	Complejo II mitocondrial
CIII:	Complejo III mitocondrial
CIV:	Complejo IV mitocondrial
CV:	Complejo V mitocondrial
CAP:	Cloranfenicol
CDS:	Secuencia codificante
Cit c:	Citocromo c
CNIC:	Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III
CO₂:	Dióxido de carbono
CoQ:	Coenzima Q
Cys:	Cisteína
DNA:	Ácido dexosirribonucleico
mtDNA:	DNA mitocondrial
nDNA:	DNA nuclear
DDM:	Dodecyl β -D-maltoside
DIG:	Digitonina
EST:	<i>Expressed sequence tag</i> (marcador de secuencia expresada)

ETF-QO:	Flavoproteína transfridora de electrones: ubiquinona reductasa
EXTL1:	<i>Exostosin-like 1</i>
EXTL1-45KDa:	Isoforma hipotética de EXTL1 de peso molecular 45KDa.
FAD:	Dinucleótido de flavina y adenina
FADH₂:	Dinucleótido de flavina y adenina reducido
FET:	Transporte “hacia delante” (<i>forward</i>) de electrones
FMN:	Flavín mononucleótido
GlcA:	Ácido β-D glucurónico
GlcNAc:	N-acetil-β-D-glucosamina
GPDH:	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa
HIG1A:	<i>Hipoxia induced gen 1A</i>
HIG2A:	<i>Hipoxia induced gen 2A</i>
H₂O₂:	Peróxido de hidrógeno
IP:	Inmunocaptura
kDa:	Kilodalton
α-KGDH:	α-Cetoglutarato
MAM:	Membranas asociadas a mitocondria
mETC:	Cadena de transporte electrónico mitocondrial
mRNA:	RNA mensajero
NAD⁺	Dinucleótido de nicotinamida y adenina
NADH:	Dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido
NADH DH:	NADH deshidrogenasa
NNT:	NAD(P) ⁺ transhidrogenasa
NO:	Óxido nítrico
NOS:	Óxido nítrico sintasa
eNOS:	Óxido nítrico sintasa endotelial

iNOS:	Óxido nítrico sintasa inducible
nNOS:	Óxido nítrico sintasa neuronal
O₂^{•-}:	Anión superóxido
OADHC:	Complejo α-cetoadipato deshidrogenasa
OGDHC:	Complejo α-cetoglutarato deshidrogenasa
OH:	Radical hidroxilo
OMA1:	Zinc metaloproteasa OMA1
OPA1:	Proteína de la atrofia óptica 1
OXPHOS:	Fosforilación oxidativa
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
BN- PAGE:	PAGE en presencia de azul de Coomassie (<i>Blue-native</i>)
SDS- PAGE:	PAGE en presencia de dodecilsulfato sódico
1D- PAGE	PAGE en primera dimensión
2D- PAGE	PAGE en segunda dimensión
pb:	Pares de bases
PDHC:	Complejo piruvato deshidrogenasa
Rcf1:	<i>Respiratory Supercomplex Factor 1</i>
Rcf2:	<i>Respiratory Supercomplex Factor 2</i>
RET:	Transporte reverso de electrones
RNS:	Especies reactivas de nitrógeno
RO:	Radical alcoxi
ROO:	Radical peroxi
SCAF1:	<i>Supercomplex Assembly Factor 1</i>
TEMED:	N, N, N', N'- tetrametiletilendiamina

Introducción

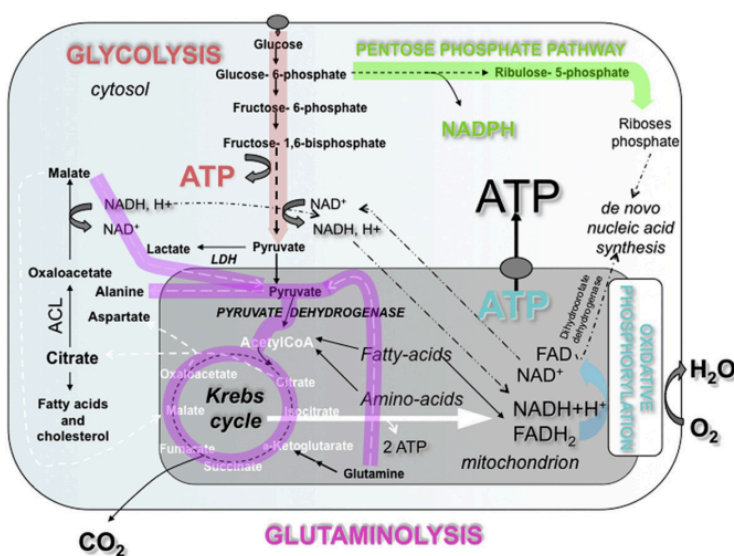
I. SISTEMA OXPHOS: CONTEXTO CELULAR.

El sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) se encuentra localizado en el interior de la mitocondria, orgánulo presente en la mayoría de tipos celulares eucariotas. Si bien son numerosas las excepciones en el caso de organismos protistas, se cree que la falta de mitocondrias se debe a una pérdida evolutiva (Gray et al 2004). La hipótesis más aceptada hasta el momento, en cuanto al origen de la mitocondria, es la adaptación de una α -proteobacteria a la simbiosis con un hospedador eucariota primitivo. Este evento, que se estima, tuvo lugar hace 1,5-2 mil millones de años implica que mitocondrias de diferentes especies tienen un origen monofilético (Hackstein et al 2006). Estudios filogenéticos sugieren que el ancestro bacteriano de vida libre poseía en torno a 3000-5000 genes, de los cuales se calcula que sólo en torno a la tercera parte perduraron tras la transición a bacteria simbiote proto-organelo. (Gray 2012). La proto-mitocondria poseía probablemente cadena de transporte electrónico, parte de las enzimas del ciclo de Krebs y las enzimas necesarias para la β -oxidación de ácidos grasos, así como rutas de síntesis de lípidos, biotina, hemo, centros sulfoferricos y transportadores de cationes. La reconstrucción de su metabolismo indica que se trataba de un organismo aerobio, al menos, facultativo (Szkarczyk and Huynen 2010).

El origen endosimbiótico de la mitocondria justifica algunas de sus principales características:

a) La mitocondria es un orgánulo de doble membrana. La membrana externa contiene proteínas necesarias para el intercambio de metabolitos y comunicación con citosol, los eventos de fusión y fisión mitocondrial, así como toda la maquinaria para el importe y ensamblaje de proteínas desde el citosol al interior de la mitocondria (Becker et al 2009). Existen también zonas en que la membrana se asocia físicamente al retículo endoplásmico a través de uniones estrechas denominadas MAM (*Mitochondria Associated Membranes*) encargadas de la regulación de funciones entre ambos orgánulos como la homeostasis de calcio y la biogénesis mitocondrial (Rodríguez-Arribas et al 2016). Mientras la membrana externa permite el paso de pequeñas moléculas (10KDa), la membrana interna es una barrera muy selectiva, que separa la matriz mitocondrial del espacio intermembrana, lo cual permite el establecimiento de un gradiente de protones necesario para la funcionalidad del sistema OXPHOS. Dentro de la membrana interna pueden distinguirse dos regiones, una limitante con la membrana externa y otra formada por invaginaciones denominadas crestas, las cuales se proyectan hacia la matriz mitocondrial y contienen la mayor parte de los complejos respiratorios. El análisis mediante tomografía electrónica ha mostrado que las crestas son estructuras casi cerradas, separadas del espacio intermembrana por estrechas uniones tubulares. Esta organización sugiere que las crestas son compartimentos especializados para limitar la difusión de moléculas importantes para el sistema OXPHOS (Cogliati, Enriquez, et al 2016, Frey and Mannella 2017).

b) La mitocondria posee un genoma propio localizado en la matriz, que en la mayoría de eucariotas está organizado como una molécula circular de DNA de doble cadena multicopia, de manera que una célula puede contener entre 100 y 10.000 copias, en función de tipo celular y demanda de energía (Chinnery and Hudson 2013). El DNA mitocondrial (mtDNA) se ha ido reduciendo a lo largo de la evolución por transferencia de genes al núcleo, de modo que la mayor parte de proteínas mitocondriales han de ser importadas desde el citosol (Neupert and Herrmann 2007). El mtDNA de mamíferos contiene 37 genes, los cuales codifican 13 proteínas integrantes del sistema OXPHOS, 22 moléculas de tRNA, y los 2 RNA ribosómicos mitocondriales 16s y 12s (Chinnery and Hudson 2013).



II. SISTEMA OXPHOS: ESTRUCTURA Y ACTIVIDAD.

II.1. Componentes y mecanismo.

El sistema OXPHOS, en la membrana interna mitocondrial, está compuesto por la cadena de transporte electrónico mitocondrial y la H^+ -ATP sintasa. La cadena de transporte electrónico (mETC) incluye tres enzimas, capaces de bombear protones, denominadas complejo I (NADH-ubiquinona oxidoreductasa), complejo III (ubiquinol-citocromo bc_1 oxidoreductasa) y complejo IV (citocromo c oxidasa). Estos complejos contienen varios cofactores redox que permiten la transferencia de electrones en el interior del complejo, mientras que el transporte electrónico entre complejos es mediado por los transportadores móviles ubiquinona (embebida en la membrana) y citocromo c (hidrosoluble). El potencial redox de los aceptores y donadores de electrones se incrementa gradualmente a lo largo de la cadena, de manera que existe liberación de energía libre a cada paso. La energía liberada en el transporte de electrones desde NADH hasta oxígeno molecular, es utilizada para el bombeo de protones en los complejos respiratorios, a través de la membrana (**Figura II.1**). Además del CI existen otras enzimas reductoras de ubiquinona, que, aunque no son capaces de bombear protones, aportan electrones a través de $FADH_2$ a la cadena. Estas son el complejo II (succinato-quinona oxidoreductasa), la flavoproteína transferidora de electrones:ubiquinona reductasa (ETF-QO), la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPDH) y la dihidroorotato deshidrogenasa, entre otras. Todas estas enzimas generan una conexión directa entre el sistema OXPHOS y otras rutas metabólicas como son el ciclo de Krebs, la β -oxidación y la síntesis de pirimidinas (Alcázar-Fabra et al 2016). El bombeo de protones, asociado al transporte de electrones, a través de la membrana interna mitocondrial, genera un gradiente electroquímico (Wallace et al 2010). El flujo de protones a través de la ATP sintasa (CV) y por tanto la disipación de dicho gradiente, produce la energía para generar el cambio conformacional que este complejo requiere para la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato (Abrahams et al 1994, Mitchell 1961). El ATP de la matriz mitocondrial es intercambiado por el ADP citosólico a través del transportador de nucleótidos de adenina (ANT) (Kunji et al 2016).

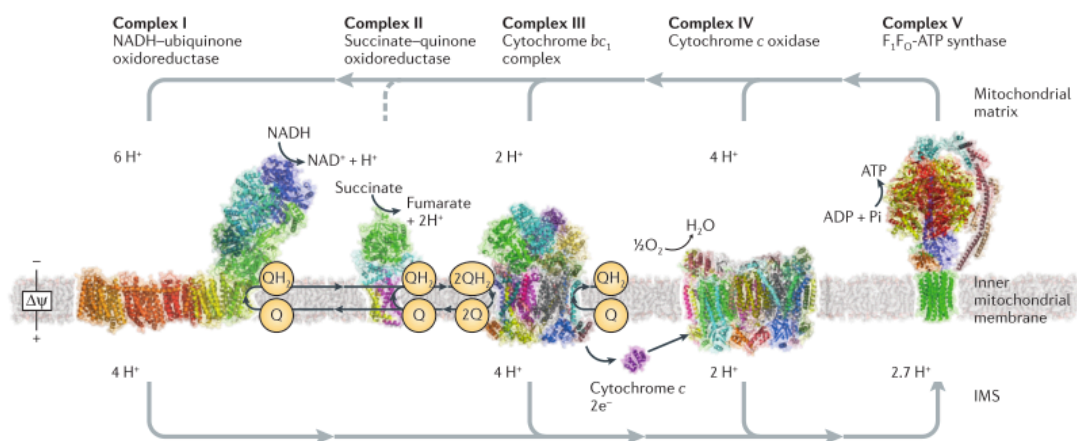


Figura II.1. Fosforilación oxidativa. El Complejo I es el punto de entrada para los electrones desde NADH, utilizados para reducir la ubiquinona a ubiquinol. El ubiquinol es utilizado por Complejo III para reducir el citocromo c en el espacio intermembrana, mientras que el Complejo IV reduce el oxígeno molecular a agua, por medio de los electrones contenidos en el citocromo c reducido. El Complejo II supone una entrada adicional de electrones a la cadena a partir de $FADH_2$. Por cada molécula de NADH oxidado, son traslocados 10 protones a través de la membrana interna mitocondrial, generando un gradiente electroquímico que el CV utiliza para la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato, en un proceso denominado fosforilación oxidativa (Leonid a. Sazanov 2015).

El gradiente electroquímico mitocondrial es también utilizado para la generación de calor por proteínas desacoplantes (Enerbäck et al 1997), el importe de proteínas y calcio a través de la membrana interna (Santo-Domingo and Demareux 2010) y la generación de NADPH por la enzima NNT, esencial en la detoxificación de especies reactivas de oxígeno (Rydström 2006).

Aunque la cadena de transporte electrónico es, en esencia, similar en todos los organismos, existen rutas alternativas en algunos de ellos. Las oxidasas alternativas (AOXs) son proteínas mitocondriales de membrana presentes en todos los reinos, excepto *Arqueobacteria*, incluyendo animales inferiores (McDonald et al 2009, Pennisi et al 2016). Son capaces de catalizar la oxidación de ubiquinol y la reducción de oxígeno a agua, de modo que la respiración tiene lugar sin transporte de electrones a través de CIII y CIV. Estas reacciones tienen lugar sin bombeo de protones, de modo que la mayor parte de la energía redox es disipada en forma de calor (Szibor et al 2017). La actividad de AOX es inhibida por ácidos hidroxámicos, sin embargo es insensible a los inhibidores de CIV cianuro (CN), azida, monóxido de carbono y óxido nítrico (NO) (Millar et al 1997). La insensibilidad de AOX, a estos y otros compuestos, permite la adaptación de algunos organismos a condiciones desfavorables para su supervivencia, como es el caso de parásitos resistentes a NO y CN producidos por sus hospedadores. Del mismo modo, esta singularidad metabólica ha sido propuesta como diana terapéutica para el tratamiento contra *Trypanosoma* (Suzuki et al 2004). Además de aportar flexibilidad metabólica adaptativa en situaciones específicas, las AOXs previenen el exceso en la producción de ROS y desequilibrios metabólicos (Szibor et al 2017).

La expresión de AOX en células de ratón p^0 fue capaz de restaurar la oxidación de CoQH_2 y la capacidad respiratoria, revirtiendo su dependencia por la adición de uridina y piruvato. (Perales-Clemente et al 2008). En células humanas la expresión de AOX, procedente del ascidio *Ciona intestinalis*, es también tolerada, y permitió mejorar el crecimiento y la susceptibilidad a agentes oxidantes de células de pacientes portadores de mutación en el gen *Cox15* (Dassa et al 2009, Hakkaart et al 2006). En *Drosophila*, la expresión revierte parcialmente el fenotipo derivado de deficiencias en CIV (Kemppainen et al 2014), mientras que en ratón se ve limitada la producción de ROS bajo ciertos estímulos (El-khouri et al 2013). Estos modelos celulares y animales son útiles para el estudio de los fenómenos ligados a la funcionalidad de la mETC, como confirma un trabajo recientemente publicado, en que el uso de AOX para regular la reducción de CoQ, permite establecer una relación entre la vía por la que las ROS son generadas y la esperanza de vida en *Drosophila* (Scialo et al 2016).

II.2. Producción de especies reactivas de oxígeno.

Tipos de especies reactivas de oxígeno y actividad.

Existen diferentes fuentes de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la célula. Algunas enzimas que producen ROS, como subproducto de la reacción de transferencia electrónica, son el citocromo p450 en retículo endoplásmico, los peroxisomas, la xantina oxidasa y la NADPH oxidasa. Sin embargo, en células no fagocíticas, la mayor fuente es la cadena de transporte electrónico (Holmström and Finkel 2014).

En condiciones reductoras, un 2-5 % del O_2 consumido por la mitocondria deriva en la producción de ROS (Rigoulet et al 2011). La primera especie reactiva de oxígeno que se

forma tras la liberación de electrones de la mETC, es el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), fruto de la reducción directa e incompleta del oxígeno molecular. Rápidamente éste es dismutado a peróxido de hidrógeno (H_2O_2), espontáneamente o por la isoforma mitocondrial de la enzima superóxido dismutasa. El H_2O_2 puede difundir a través de las membranas biológicas. A partir de éste puede generarse, en presencia de iones metálicos como el hierro, el radical hidróxilo (OH^{\cdot}) capaz de reaccionar principalmente con ácidos grasos, por lo que resulta extremadamente tóxico para la célula. Otras especies de este tipo son los radicales alcoxil y peroxil (RO^{\cdot} y ROO^{\cdot}). Para minimizar los daños producidos por estas especies tan reactivas en proteínas, lípidos y DNA, la mitocondria posee un intrincado sistema de defensa antioxidante compuesto por enzimas como superóxido dismutasa, glutathione peroxidasa, catalasa y peroxirredoxinas (Murphy et al 2015). De esta forma, en condiciones fisiológicas, el nivel de ROS se encuentra minimizado para evitar daño oxidativo. De producirse un desequilibrio entre la producción y la detoxificación de ROS, la célula sufrirá estrés oxidativo, fenómeno implicado en muerte celular y en el desarrollo de gran cantidad de patologías (Tiwari et al 2012).

En condiciones fisiológicas, las ROS funcionan como moléculas señalizadoras implicadas en la regulación de muchos procesos fisiológicos como son diferenciación celular, inmunidad, envejecimiento, y homeostasis mitocondrial. Un mecanismo bien entendido en señalización redox implica la oxidación reversible de residuos de cisteínas por medio de H_2O_2 . Los residuos de cisteína se encuentran en gran parte como anión tiolato (Cys-S⁻) a pH fisiológico, siendo más susceptibles de oxidación que el tiol protonado (Cys-SH). Durante la señalización redox, el H_2O_2 oxida el tiolato a su forma sulfénica (Cys-SOH) produciendo cambios alostéricos en la proteína. El residuo puede volver a su forma reducida, con o sin previa conjugación con glutathione reducido, por acción de las enzimas tioredoxina y glutaredoxina. Niveles más elevados de H_2O_2 pueden generar la forma sulfínica (SO_2H) o sulfónica (SO_3H) del grupo tiol, las cuales son modificaciones irreversibles. Los cambios de H_2O_2 necesarios para señalización no causan cambios significativos en los ratios intracelulares de glutathione oxidado/reducido y NADPH/NADP⁺, indicativos del estado de las defensas antioxidantes (Schieber and Chandel 2014). La acumulación de anión superóxido está más asociada con daño oxidativo que con señalización celular, si bien existen proteínas específicamente sensibles a la inactivación por superóxido (Y Chen et al 2009). El radical hidroxilo genera daño de forma indiscriminada, por lo que existen muchos mecanismos para el control de la homeostasis de hierro (Schieber and Chandel 2014).

Otras moléculas reactivas, fuente de estrés oxidante y con importante función señalizadora, son las denominadas especies reactivas de nitrógeno (RNS). Dichas especies son derivadas de la reacción del óxido nítrico (NO) con el oxígeno molecular. El NO es una importante molécula señalizadora, producida a partir de L-arginina por tres isoformas extramitocondriales de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). Dichas isoformas poseen funciones fisiológicas tan relevantes como control del tono vascular (eNOS), regulación de la neurotransmisión (nNOS) y mediación de inflamación y shock séptico (iNOS) (Sessa and Fo 2012). Una vez producido, el NO puede difundir a mitocondria. Existen además fuentes intramitocondriales de NO, aunque las rutas metabólicas implicadas y la posible existencia de una isoforma mitocondrial de NOS están bajo debate (Lacza et al 2015).

Entre los numerosos efectos que el NO y sus derivados RNS producen a nivel celular, cabe destacar su gran influencia sobre la actividad de la mETC. NO y RNS son capaces de inhibir la respiración mitocondrial de diferentes maneras. El NO puede producir una rápida selectiva, potente e irreversible inhibición por nitrosilación de enzimas que contengan grupo hemo como es el caso del CIV, aunque a bajas concentraciones inhibe la respiración por la

competición con el O_2 , especialmente en condiciones de hipoxia (Lacza et al 2015). Sin embargo, los RNS, como el peroxinitrito resultante de la reacción entre NO y anión superóxido liberado en la mETC, causa inhibición no selectiva, débil e irreversible de CI, CII, CIV, CV, aconitasa y superóxido dismutasa entre otras. (Brown and Borutaite 2004)

La producción de $O_2^{\cdot -}$ en la cadena de transporte electrónico se da en CI y CIII, aunque existen descritos hasta 8 sitios productores de $O_2^{\cdot -}$ y H_2O_2 en enzimas donadoras de NADH y $FADH_2$ (Brand 2016). Las ROS producidas por CI son liberadas por completo a la matriz mitocondrial, mientras que las generadas por CIII son liberados mayormente al espacio intermembrana, como se desprende de la localización diferencial de las proteínas oxidadas por uno u otro complejo (Bleier et al 2015).

Producción de ROS en CI.

El modo en que CI produce $O_2^{\cdot -}$ se encuentra íntimamente ligado a su estructura. El CI está compuesto por 44 subunidades (980 kDa). De éstas, 14 centrales conservadas están implicadas en los mecanismos de transferencia electrónica y bombeo de protones y 30, denominadas supernumerarias, relacionadas con ensamblaje y estabilidad (Leonid A. Sazanov et al 2013). Dado que se trata de uno de los más grandes complejos proteicos de membrana, la definición de su estructura atómica ha sido ardua. Recientemente ha sido descrita por criomicroscopía la estructura atómica de CI de ovino a una resolución de 3,9 Å y de bovino a 4,2 Å (Fiedorczuk et al 2016, Zhu et al 2016). Estas estructuras y las previamente resueltas por cristalografía de rayos X para *Thermus thermophilus* y *Yarrowia lipolytica*, han sido de gran ayuda para dilucidar los mecanismos relativos a su función (Baradaran et al 2013, Zickermann et al 2015).

El CI tiene forma de “L”, con un brazo hidrofílico que contiene el cofactor FMN para la oxidación del NADH y 8 centros sulfoferricos, de los cuales 7 están encargados del transporte de electrones hasta la CoQ; y un brazo de membrana, que contiene 78 hélices transmembrana que contribuyen a traslocación de protones (Fiedorczuk et al 2016). La estructura del CI es modular, lo cual resulta coherente con su historia evolutiva desde bacteria a humano. En la compleja ruta de ensamblaje de CI, primero son ensamblados los módulos Q y P, a los que se une posteriormente el módulo N. El módulo N es el encargado de la unión del NADH y su oxidación (incluye FMN y 5 de los centros sulfoferricos), el módulo Q es el encargado de la transferencia de electrones a la CoQ (incluye 3 centros sulfoferricos y el sitio de unión de CoQ), y el módulo P está involucrado en el bombeo de protones (Guerrero-Castillo et al 2016).

El CI puede alternar entre dos conformaciones, denominadas activa (A) e inactiva (D) que afectan a la estructura en el módulo Q y a la zona de unión entre el módulo N y el P. Dicha transición puede modularse por ligandos, en función del flujo electrónico o por efecto de modificaciones covalentes que impidan la reactivación de la forma A, como sería el caso de la inhibición de CI por nitrosilación debida a NO (Dröse et al 2016).

Bajo condiciones fisiológicas, el CI cataliza el transporte “hacia delante” de electrones (FET) desde el NADH, a través de los centros sulfoferricos hasta la CoQ. Sin embargo, esta reacción de óxido reducción es totalmente reversible, a expensas de la fuerza protón motriz generada por la mETC, con un alto ratio $CoQH_2/CoQ$. La enzima puede transferir los electrones del ubiquinol para la reducción de NAD^+ en un proceso denominado transporte reverso de electrones (RET) (Murphy 2009). En ambos casos, el CI es capaz de producir ROS, siendo mucho mayor la cantidad producida durante RET (con alto potencial de membrana y ratio CoH_2/CoQ) que durante el FET (con alto ratio $NADH/NAD^+$) (Dröse et al 2016).

Existe cierta unanimidad en cuanto a que el cofactor FMN es el lugar donde se da la producción de superóxido en el caso de FET (Dröse et al 2016). Sin embargo, no existe consenso en cuanto al lugar de generación de ROS debido a RET. El hecho de que diferentes inhibidores de CI, unos capaces de unir FMN y otros el sitio de unión de CoQ, sean capaces de inhibir la producción de ROS vía RET en presencia de succinato, es una evidencia a favor de la consideración de la flavina reducida como única fuente de ROS en CI (Pryde and Hirst 2011). Sin embargo, también fue descrita la existencia de dos sitios diferentes de generación de ROS, uno en relación con el estado redox del NADH (sitio para ROS vía FET) y otro en relación al estado redox de la CoQ (sitio para ROS vía RET) (Treberg et al 2011). Existen, por tanto, dos modelos contrapuestos.

Producción de ROS en CIII.

La producción de ROS por el CIII se encuentra ligada a la formación de ubisemiquinona durante el denominado ciclo Q de transferencia de electrones desde CoQ a citocromo c, en el que se encuentran implicados los sitios Q_0 y Q_1 del complejo (Turrens et al 1985). La estabilización de la ubisemiquinona en el sitio Q_0 permite la producción de anión superóxido por reacción con O_2 . Dicha estabilización es exacerbada por la unión del inhibidor de CIII antimicina al sitio Q_i , lo que ha hecho que estudios de localización de producción de ROS, basados en el uso de inhibidores de la mETC, confirieran gran importancia a la contribución del CIII en la generación de anión superóxido. Sin embargo, en ausencia de antimicina, o en presencia de inhibidores de CIV, la producción de superóxido por CIII es muy pequeña, por lo que se estima que la contribución de CIII a la generación de ROS en mETC es mucho menor de lo que en principio se pensaba (Murphy 2009).

Durante el RET, el incremento en la ratio $CoQH_2/CoQ$ y el potencial de membrana, podrían estabilizar la ubisemiquinona en el sitio Q_0 , de manera que CIII pudiera generar anión superóxido. Sin embargo, la producción de ROS durante RET, generado vía aporte de succinato, se elimina si se añade rotenona, inhibidor de CI, deduciéndose por tanto la baja contribución de CIII (Lambert and Brand 2004, Murphy 2009). En situaciones en que las proporciones $NADH/NAD^+$ y $CoQH_2/CoQ$ no se encuentra anormalmente incrementadas, y por tanto el CI produce poco anión superóxido, la contribución de CIII a la producción de ROS podría ser mayor (Murphy 2009).

Otros sitios de producción de ROS en mitocondria.

Todos los complejos pertenecientes al grupo de complejos de deshidrogenasas mitocondriales de α -cetoácidos, contienen la dihidrolipoil deshidrogenasa responsable de la reducción de NAD^+ . Los complejos de este tipo, capaces de producir ROS, son el complejo piruvato deshidrogenasa (PDHC), el complejo 2-oxoglutarato deshidrogenasa (OGDHC), y los complejos responsables de catabolismo de aminoácidos, complejo deshidrogenasa de α -cetoácidos de cadena ramificada (BCOADHC) y complejo α -cetoadipato deshidrogenasa (OADHC). Todos ellos, principalmente OGDHC, incrementan su producción de ROS cuando su aceptor NAD^+ es limitado o cuando la ratio $NADH/NAD^+$ es muy elevado (Brand 2016).

Las enzimas reductoras de CoQ; CII, dihidroorotato deshidrogenasa, flavoproteína transferidora de electrones:ubiquinona reductasa, y glicerol-3-fosfato deshidrogenasa pueden producir ROS de forma indirecta, por inducción de RET en CI, o en algunos casos por su propia actividad redox (Murphy 2009).

III. SISTEMA OXPHOS: ORGANIZACIÓN.

III.1. Modelos de organización del sistema OXPHOS.

El modo en que los componentes de la cadena de transporte electrónico se encuentran organizados ha sido objeto de intenso debate durante varias décadas. Durante los años 50 y principios de los 60 el modelo más aceptado para explicar la organización del sistema OXPHOS era el llamado “modelo sólido” propuesto por Keilin y Hartree en 1947 (Keilin and Hartree 1947). Este modelo planteaba que los componentes debían encontrarse en un contexto más o menos rígido que asegurara su accesibilidad mutua y una rápida catálisis (Keilin and Hartree 1947, Slater 2003). En este mismo modelo se encontraban enmarcados los estudios cinéticos de Chance y Williams (Chance et al 1955, Chance and Williams 1955). El cuestionamiento del modelo sólido se inició con el aislamiento de los cuatro complejos respiratorios, los cuales resultaron ser activos tras purificación y reconstitución (Hatefi et al 1962). Al mismo tiempo otros estudios mostraron que los transportadores móviles presentaban un comportamiento cinético de *pool* homogéneo, es decir, se trataba de intermediarios móviles y difusibles no compartimentalizados (Green and Tzagoloff 1966, Kröger and Klingenberg 1973). Diversos estudios realizados en mitocondria intacta corroboraron el carácter difusible de la coenzima Q entre CII y CIII, si bien no se obtuvieron datos claros en cuanto al comportamiento de citocromo c (Stoner 1984). Otra evidencia aportada en contra del modelo imperante fue la disminución en la velocidad de transferencia de electrones tras dilución de la membrana interna con liposomas, efecto que era revertido con el uso de fosfolípidos suplementados con ubiquinona (Schneider et al 1982).

En 1986 Hackenbrock y colaboradores publicaron los cinco postulados sobre los que se fundamentaba el llamado “modelo fluido”, según el cual todos los componentes de la mETC se encontrarían aleatoriamente distribuidos en un plano de la membrana interna difundiendo independientemente unos de otros. El transporte de electrones se entendía como un proceso debido a colisiones aleatorias y cuya cinética sería dependiente de la velocidad de difusión de la coenzima Q (Hackenbrock et al 1986). Este trabajo se encontraba sustentado sobre varios estudios cinéticos previos (Gupte et al 1984, Hackenbrock et al 1976, Höchli and Hackenbrock 1979, Schneider et al 1982) si bien los valores de coeficiente de difusión de la coenzima Q obtenidos por otros autores eran más acordes con un modelo, también de colisión, pero no limitado por la velocidad de difusión de ésta (G Lenaz and Fato 1986).

Este modelo fue mayoritariamente aceptado hasta la publicación, en el año 2000, de la resolución de asociaciones entre complejos respiratorios por electroforesis nativa (*blue-native PAGE*), que fue interpretada como la demostración del ensamblaje de los complejos respiratorios en estructuras supramoleculares funcionales denominadas “supercomplejos” (SCs) (H Schagger and Pfeiffer 2000). En este trabajo se proponía un modelo de organización denominado “respirasoma” formado por dos copias de $I_1III_2IV_4$ y una copia de III_2IV_4 . Sin embargo, esta hipótesis, que pretendía adaptarse a la estequiometría 1:3:6 de los complejos I:III:IV propuesta por el “modelo sólido”, no correlacionaba con los supercomplejos resueltos por electroforesis. La presencia de complejos aislados y supercomplejos no esperados como I_1III_2 , y la ausencia del predicho III_2IV_4 se interpretaban como artefactos debidos a la solubilización de membranas (H Schagger and Pfeiffer 2000). Del mismo modo, investigadores del campo consideraron que la propia obtención de supercomplejos, tras solubilización de membranas con detergentes y tratamiento posterior con azul de Coomassie, podría ser artefactual y no representativa de una organización *in*

vivo (Enríquez 2016). Sin embargo, en varias especies fueron caracterizadas nuevas y diferentes asociaciones entre complejos (Acín-Pérez et al 2008, Krause, Reifschneider, et al 2004, Nübel et al 2009, Suthammarak et al 2009), en ocasiones sin necesidad de solubilización por detergentes (Althoff et al 2011).

La coexistencia de evidencias válidas a favor de uno y otro modelo a nivel cinético (Giorgio Lenaz and Genova 2007) y a nivel estructural (Boekema and Braun 2007), llevaron a la propuesta de un nuevo modelo de organización denominado “modelo de plasticidad”. (Figura III.1). Este modelo considera cada uno de los dos modelos anteriores como extremos de una situación en la que realmente conviven diferentes tipos de supercomplejos con complejos aislados en una organización dinámica (Acín-Pérez et al 2008).

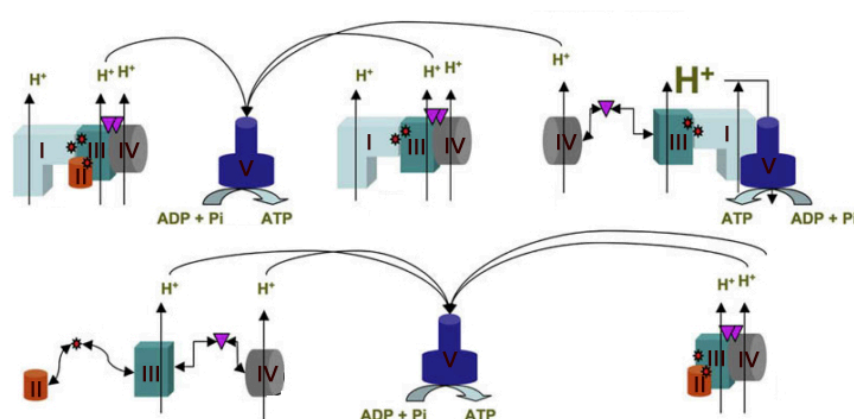


Figura III.1. Modelo de plástico. El modelo plástico se basa en la existencia de diferentes asociaciones posibles entre complejos respiratorios. En la figura se muestran algunas de las asociaciones propuestas. Asterisco rojo, Coenzima Q. Triángulos rosas, citocromo c. El resto de complejos se nombran en la figura. Imagen modificada a partir de (Acín-Pérez et al 2008).

Además de la caracterización de los diferentes tipos de supercomplejos presentes en cultivos celulares y tejidos de ratón, este trabajo aportó evidencias cruciales para la aceptación posterior de la existencia de supercomplejos *in vivo*:

- La migración de los supercomplejos en electroforesis nativa responde a una interacción real dado que, la pérdida de alguno de los complejos asociados, cambia dicho perfil de migración.
- Existe un margen temporal entre el ensamblaje de los complejos individuales y los supercomplejos, por lo que se descarta que estos últimos sean agregados artefactuales.
- Algunos supercomplejos contienen coenzima Q y/o citocromo c.
- Los supercomplejos resueltos por electroforesis que contienen todos los complejos y transportadores necesarios para la respiración son, en efecto, capaces de consumir oxígeno, lo que demuestra la funcionalidad de las asociaciones descritas por migración en gel (Acín-Pérez et al 2008).

Estudios posteriores han puesto de manifiesto las implicaciones funcionales de este tipo de organización, en el que la naturaleza dinámica de las asociaciones entre complejos respiratorios permite la adaptación de la mETC a diferentes estímulos, abriendo un apasionante campo de estudio (Lapiente-Brun et al 2013).

III.2. Supercomplejos respiratorios.

III.2.1. Estructura y asociaciones de complejos respiratorios.

La aproximación experimental más útil para la caracterización de la organización del sistema OXPHOS ha sido el uso de electroforesis en condiciones nativas, denominada *blue-native PAGE* (**Figura III.2**). Esta técnica permite la resolución de complejos y SCs respiratorios tras solubilización de las membranas mitocondriales con detergentes suaves no iónicos, usualmente digitonina (Schägger and Pfeiffer 2000), si bien los resultados fueron reproducibles en varias especies con otros detergentes (Acín-Pérez et al 2008, Eubel et al 2003, Schägger 2001). De este modo se ha descrito la existencia de SCs en amplia variedad de especies eucariotas desde hongos a vertebrados, con diferencias importantes en la proporción y cantidad de cada uno de ellos según el organismo.

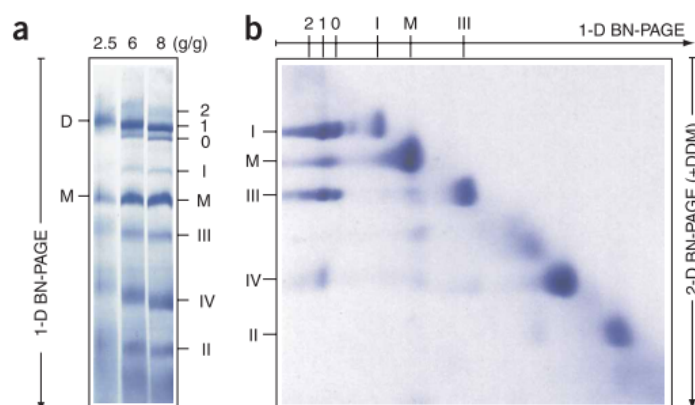


Figura III.2. Blue-native PAGE. Este tipo de electroforesis de proteínas, denominada Blue-native PAGE por el color adquirido por el gel tras el uso de azul de *Coomassie*, permite la resolución de grandes moléculas en condiciones nativas. En el caso de membranas mitocondriales, solubilizadas con detergentes, es posible resolver los complejos y supercomplejos respiratorios. A) 1D-BN-PAGE o electroforesis nativa en 1ª dimensión. Realizada a partir de mitocondrias de bovino, permite observar complejos respiratorios y sus asociaciones en SCs. En la parte superior se indica la relación digitonina/proteína (gramo/gramo) utilizada para la solubilización. B) La línea de 8 g/g presente en el gel en a) fue resuelta en una 2D BN-PAGE (electroforesis en condiciones nativas en 2ª dimensión). Para ello la banda que contenía los complejos y SCs fue tratada con DDM, detergente capaz de romper las interacciones entre complejos. De este modo es posible estudiar la composición en complejos de cada supercomplejo resuelto previamente en 1ª dimensión. I, II, III y IV indican los complejos respiratorios. (0), (1) y (2) indican, respectivamente, el número de copias de CIV estimadas en la banda. M y D indican monómero o dímero de CV. Imagen extraída de (Wittig, Braun, et al 2006).

La caracterización de SCs en plantas superiores mostró gran abundancia de $I+III_2$ con un 50-90% del CI total (Eubel et al 2003) y la existencia de SCs III_2+IV_{1-2} y $I+III_2+IV_{1-4}$, si bien entorno al 90% del CIV permanecía en forma monomérica (Eubel et al 2004, Krause, Reifschneider, et al 2004).

La asociación más descrita en hongos es la de $CIII_2$ con CIV o CIV_2 . En el caso de *S. cerevisiae*, carente de CI, la totalidad del CIV queda contenido en SCs. En otras especies como *Y. lipolytica*, *N. crassa* y *P. anserina* se han descrito asociaciones entre CI, III_2 y IV con diferentes estequiometrías. Una particularidad de estas especies es la presencia de dímeros de CI (Krause, Scheckhuber, et al 2004, Marques et al 2007, Nübel et al 2009).

Los SCs de mamíferos como ratón (Acín-Pérez et al 2008), bovino (Schägger and Pfeiffer 2000) y humano (Schägger et al 2004) se caracterizan por el alto grado de asociación de CI en SCs. En el caso de mitocondria bovina de corazón tras solubilización con digitonina, en torno al 84% de CI se encuentra asociado en SCs (17% $I+III_2$, 67% $I+III_2+IV_{1-4}$), mientras que $CIII_2$ (40-42%) y CIV (85%) se encuentran en gran medida en

forma libre. A su vez, la mayor parte de CIII₂ y CIV en SCs se asocian a CI; si bien la existencia de III₂IV y IV₂ está claramente descrita en mamíferos (H Schägger 2001).

La posibilidad de purificar los SCs por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa y cromatografía de afinidad, ha permitido la caracterización de algunos de ellos por medio de crio-microscopía electrónica de partículas únicas y crio-tomografía electrónica. Es el caso de los SCs I+III₂ en *Arabidopsis* (Natalia V Dudkina et al 2005) y *Bos Taurus* (Schäfer et al 2006), III₂+IV₂ en *S. Cerevisiae* (Mileykovskaya et al 2012) y I+III₂+IV en *Bos taurus* (Althoff et al 2011, Dudkina et al 2011, Schäfer et al 2006).

Estos modelos de respirasoma poseen una resolución de entre 19 y 36 Å, insuficiente para caracterizar las interacciones entre ellos. El avance en las técnicas de detección y de procesamiento de imagen, ha permitido recientemente la resolución de la estructura de respirasoma a 9 Å para mitocondria de bovino (Sousa et al 2016) y a 5,4 Å para ovino y porcino (Gu et al 2016, Letts et al 2016). Además, el grupo de M. Yang refinó su estructura de respirasoma de cerdo hasta 4 Å de resolución (Wu et al 2016).

Los estudios llevados a cabo en los laboratorios de L.A.Sazanov (respirasoma ovino) y M.Yang (respirasoma porcino), además de la precisión en la localización de las subunidades en la estructura y de la caracterización de interacciones proteína-proteína entre complejos, aportan observaciones y conclusiones de índole funcional (Letts et al 2016, Wu et al 2016):

a) En preparaciones de corazón ovino, se describen dos conformaciones de respirasoma denominadas “ajustada” y “suelta” que difieren en la interacción o no entre los complejos III y IV. En el primer caso se encuentran puntos de contacto claros entre IV y III₂, en el segundo el IV aparece desplazado hacia la parte distal del brazo de membrana de CI perdiendo los puntos de contacto con CIII₂. (Letts et al 2016) (**Figura III.3**). En respirasoma de cerdo también se encontró que las partículas podían ser agrupadas en dos tipos, según proximidad de los brazos de matriz de CI y CIII₂ (Wu et al 2016).

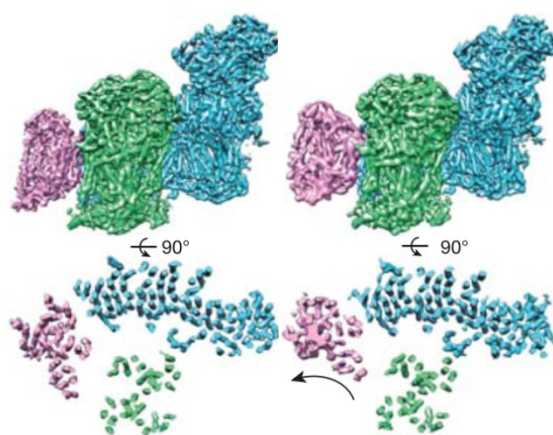


Figura III.3. Mapas de densidad, generados por crio-microscopía electrónica, de diferentes conformaciones de respirasoma. Dos conformaciones de respirasoma, con diferente posición de CIV, fueron descritos durante el trabajo que llevó a la resolución de la estructura de respirasoma de ovino. A la derecha una conformación más ajustada permite la interacción entre CIV y CIII₂. A la izquierda la conformación “suelta” aproxima CIV a CI, perdiéndose la interacción entre CIV y CIII₂. Azul, CI; verde, CIII₂; rosa, CIV. Figura modificada extraída de (Letts et al 2016)

b) Yang y colaboradores propusieron un nuevo modelo alternativo al ampliamente aceptado “Ciclo Q” para explicar la transferencia de electrones entre CoQ y Cit c. Su modelo supone un solo sitio de unión de CoQ en cada monómero de CIII, de forma que,

desde el CoQH_2 unido al monómero más distal, los dos electrones se transfieren permitiendo la reducción de una molécula de Cit c en cada monómero de forma simétrica (Wu et al 2016). Sazanov, sin embargo, propone un flujo de electrones asimétrico en CIII_2 . En ese mismo sentido concluye otro trabajo publicado pocos meses después, según el cual la asimetría observada en su estructura de respirasoma de bovino sólo es compatible con un monómero de CIII inactivo y otro monómero de CIII siempre activo pivotando entre los sitios de unión de CoQ y Cit c presentes en CI y CIV respectivamente (Sousa et al 2016).

c) Yang y colaboradores proponen que los SCs podrían encontrarse organizados en estructuras circulares en las que dos respirasomas compartieran como eje central un dímero de CIII, formando una estructura de estequiometría $\text{CI}_2\text{III}_2\text{IV}_2$. La hipótesis se basa en la resolución de bandas de peso molecular mucho mayor al de respirasoma en *blue-native PAGE* y en la detección de una población minoritaria de supercomplejos acorde al modelo, durante el análisis de las muestras de respirasoma purificadas para el estudio. El grupo de Sazanov plantea la posible unión de respirasomas por medio de sus CIV (Letts et al 2016, Wu et al 2016).

La propuesta de organización de SCs en asociaciones mayores no es nueva. Ya en 1989 se planteó la existencia de hileras de CV_2 junto a otras partículas, que fueron interpretadas como CI, en estudios de criofractura en *Paramecium* (Allen et al 1989). En 2006 se propuso el modelo de “cordones respiratorios” según el cual los SCs se encontrarían organizados linealmente (Wittig, et al 2006). Más adelante se propusieron modelos de cordones respiratorios en mitocondria de patata vía interacciones CI-CI (Bultema et al 2009) y en levadura y bovino vía interacciones IV_2 y IV_4 respectivamente (Wittig and Schägger 2009). Sin embargo, estudios por criotomografía electrónica han confirmado la existencia de hileras de CV_2 y descartado la presencia de cordones respiratorios en esos mismos modelos (Davies et al 2011) (**Figura III.4**).

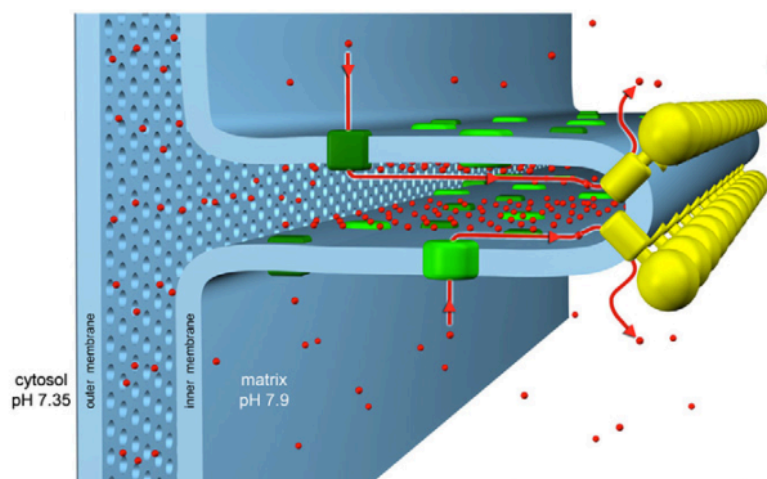


Figura III.4. Modelo de organización de crestas mitocondriales a partir de análisis por criotomografía electrónica. Según el modelo propuesto por Davies y colaboradores, la ATP sintasa (en color amarillo) forma dímeros en el extremo apical de las crestas, mientras que CI (en verde) se encuentra mayoritariamente en las zonas adyacentes a membrana. De este modo, se genera un gradiente de protones local utilizado por los dímeros de ATP sintasa de forma óptima. Extraído de (Davies et al 2011).

III.2.2. Ensamblaje de supercomplejos.

Ruta de ensamblaje.

El primer estudio del ensamblaje de SCs se realizó mediante estudios de marcaje de proteínas mitocondriales de síntesis reciente y su seguimiento durante el ensamblaje, en ensayos de pulso-caza (Acín-Pérez et al 2008). Según este estudio los complejos respiratorios son enteramente ensamblados antes de su asociación en SCs, dado que existe un lapso temporal entre el ensamblaje de los complejos individuales y el de los SCs (Acín-Pérez et al 2008). Posteriormente, se utilizaron inhibidores reversibles de la traducción mitocondrial para eliminar completamente los complejos respiratorios de células en cultivo. La retirada del inhibidor permitió la recuperación de los complejos respiratorios ausentes. El proceso de reensamblaje se monitorizó, paso a paso, con anticuerpos contra algunas subunidades representativas de cada módulo o complejo (Moreno-Lastres et al., 2012). A partir de estudios realizados con esta estrategia, se propuso un modelo según el cual, un subcomplejo de CI carente del módulo NADH deshidrogenasa (módulo N), necesitaría de una interacción previa con CIII₂ y CIV para completar su ensamblaje en el marco del respirasoma (Moreno-Lastres et al., 2012). La discrepancia entre los modelos de 2008 y 2012 podría deberse al hecho de que el estudio de 2008 fue realizado en células murinas que mantenían intacta su capacidad respiratoria durante el ensayo, mientras que el de 2012 utilizaba células humanas a las que se les inducía una carencia total de complejos y por tanto deficiencia respiratoria, lo que podría acelerar la formación de SCs permitiendo la interacción entre complejos incompletos (Enríquez 2016).

La discrepancia fue resuelta mediante la repetición de los estudios de 2012 aplicando espectrometría de masas para caracterizar completamente la composición de los subcomplejos formados durante el reensamblaje de los complejos (Guerrero-Castillo et al 2016). Este análisis permitió, por una parte, establecer un detallado modelo de ensamblaje de CI y por otra determinó que el CI se ensambla íntegramente previamente a la formación de SCs (Guerrero-Castillo et al 2016). Esta conclusión se sustentó en la observación de que la mayoría de los factores de ensamblaje, principalmente unidos a módulos transmembrana, se encuentran unidos al CI hasta las fases finales de ensamblaje, lo que hace improbable el hecho de que un CI incompleto pueda incorporarse a SCs. Además, no se detectó un módulo N totalmente preensamblado ni SCs que contuvieran complejos incompletos. Por último, al igual que en la propuesta de 2008 (Acín-Pérez et al 2008), se encontró una demora temporal entre la aparición de CI y el ensamblaje de SCs (Guerrero-Castillo et al 2016).

Factores no proteicos implicados en estabilidad de SCs.

El factor no proteico conocido más importante en la estabilización y función de los supercomplejos respiratorios es la cardiolipina. Este fosfolípido está presente, en eucariotas no fotosintéticos, sólo en la membrana mitocondrial interna. Sus propiedades físicas más relevantes son la capacidad de interacción no covalente con proteínas y su separación lateral de otros fosfolípidos para formar dominios de membrana (Schlame and Ren 2009). Se considera necesaria para el mantenimiento del potencial de membrana y la función mitocondrial (Gohil et al 2004, Jiang et al 2000).

Sitios de unión de cardiolipina a CIII y CIV fueron propuestos por técnicas indirectas (Arnarez et al 2013). El mapa de respirasoma publicado recientemente muestra presencia y posición precisa de los fosfolípidos cardiolipina, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina mediando interacción entre subunidades de CI (Wu et al 2016). La cardiolipina ha sido

asociada a funciones catalíticas en la mETC, como la generación de ambiente lipofílico para la interacción de complejos con CoQ (Giorgio Lenaz and Genova 2007), y su presencia ha sido descrita como indispensable para la actividad de CI, CIII y CIV (Fry and Green 1980, 1981).

Se ha descrito la implicación de cardiolipina en formación de supercomplejos en levaduras (Mei Zhang et al 2005). Células deficientes en cardiolipina presentaron inestabilidad de supercomplejo $\text{III}_2\text{+IV}_2$, la cual no pudo ser prevenida por el incremento de otros fosfolípidos como fosfatidiletanolamina y fosfatidilglicerol (Pfeiffer et al 2003). Estudios de mutagénesis dirigida describieron que la estabilización de SCs mediada por cardiolipina se produce por neutralización de carga de residuos de lisina localizados en la zona de interacción de CIII y CIV (Wenz et al 2009). En humanos, el síndrome de Barth, producido por la mutación en el gen codificante para la proteína encargada de la remodelación de la cardiolipina, presenta desestabilización de los SCs respiratorios (McKenzie et al 2006). Se ha postulado que el incremento de masa mitocondrial sería responsable de la compensación del metabolismo mitocondrial observada en linfoblastos de pacientes (Gonzalvez et al 2013).

Los eventos de fusión y fisión mitocondrial regulan la morfología mitocondrial que oscila, entre un estado de elongación e interconexión en redes mitocondriales, y un estado de fragmentación y separación entre ellas. Estos eventos, junto con la mitofagia, permiten la reorganización de los componentes mitocondriales y la eliminación de material dañado, significando por tanto importantes mecanismos de control de calidad. Sin embargo, recientemente, se ha establecido también una relación entre la modulación de la forma de la mitocondria y el estado energético de la célula (Liesa and Shirihai 2013).

Los cambios morfológicos de la mitocondria implican también reorganización de su ultraestructura, concretada en la denominada “remodelación de crestas mitocondriales”. Este proceso fue bien descrito en apoptosis, durante la cual las crestas mitocondriales son desestructuradas para permitir la movilización del Cit c almacenado en su interior (Scorrano et al 2002). La relación entre remodelación de crestas y estabilidad y función de SCs fue descubierta modulando la expresión de OPA1, una de las proteínas implicadas en dinámica mitocondrial y cuya mutación produce una enfermedad caracterizada por degeneración del nervio óptico. OPA1 forma oligómeros responsables de la integridad de las uniones estrechas en la base de las crestas mitocondriales, las cuales son desintegradas en apoptosis. La ablación de OPA1 y la disrupción de la remodelación de crestas, alteró el ensamblaje de SCs y el metabolismo mitocondrial, mientras que una pequeña sobreexpresión de OPA1 incrementó la formación de SCs y la respiración mediada por CI (Cogliati et al 2013). La sobreexpresión de OPA1 en modelos de enfermedad mitocondrial, con afectación de estabilidad de CI o CIV, produjo una mejora del fenotipo que correlacionaba con la mejora en la morfología de crestas y en la estabilidad de SCs (Civiletto et al 2015). La proteasa OMA1, encargada del procesamiento de OPA1, también ha sido descrita como necesaria para la estabilización de SCs. Sin embargo el rol de OMA1 no parece restringido al procesamiento de OPA1, ya que es capaz de mediar estabilización de SCs en levaduras, en las cuales el homólogo de OPA1, Mgm1, no es su sustrato (Bohovych et al 2015).

Se ha planteado la posibilidad de que el potencial de membrana mitocondrial pudiera ejercer un efecto sobre la estabilidad de SCs en base a análisis de control metabólico en estados de respiración 3 y 4. Los coeficientes de control de flujo de CI, CIII y CIV en estado respiratorio 3, con bajo potencial de membrana, arrojaron un valor compatible con canalización de sustrato en respirasoma. En estado respiratorio 4, con alto potencial de

membrana, se hallaron valores coherentes con una organización no acomplejada. (Dalmonte et al 2009, Piccoli et al 2006).

Factores de ensamblaje.

En 2012, tres grupos independientes categorizaron dos proteínas, Rcf1 y Rcf2, como factores de ensamblaje de SCs en *S. Cerevisiae*, por su interacción con CIV e, indirectamente, con CIII. Estas proteínas son necesarias para el ensamblaje de COX3 en el CIV maduro y, si bien su pérdida supone desestabilización de SCs, existen efectos más claros sobre la actividad de CIV, lo que hace que muchos investigadores del campo las consideren realmente factores de ensamblaje de CIV (Yu Chan Chen et al 2012, Strogolova et al 2012, Vukotic et al 2012). De hecho, el silenciamiento de las proteínas HIG1A y HIG2A, ortólogos de Rcf1 en mamíferos, produjo una ligera disminución de SCs, tan solo de los que contenían CIV y únicamente en el caso de HIG2A (Yu Chan Chen et al 2012). Un reciente estudio propone la participación de Rcf1 en el ensamblaje y actividad de CIV por asociación transitoria y dinámica, mediante remodelación de cardiolipina y otras especies lipídicas (Garlich et al 2017). La proteína redenominada UQCC3, implicada en unión a cardiolipina y otros fosfolípidos, ha sido también relacionada con estabilidad de SCs en células humanas, si bien está implicada en fases tempranas de ensamblaje de CIII (Desmurs et al 2015).

COX7A2L fue descrito como el primer factor de ensamblaje específico de SCs, por lo que fue renombrado “SCAF1”, por sus siglas en inglés (*SuperComplex Assembly factor 1*). Su función es permitir la interacción entre CIII y CIV, que en mamíferos se encuentran principalmente asociados en CIII₂+IV y respirasoma. Se han descrito dos formas de SCAF1 en líneas de ratón de experimentación usualmente utilizadas. Una de ellas, más corta por una microdelección, no es capaz de generar dicha interacción (Lapiente-Brun et al 2013). La descripción del primer factor de ensamblaje de SCs aporta una evidencia incontestable de la existencia de SCs *in vivo*.

Recientemente, fue propuesto un modelo de dimerización y superensamblaje de CIV que implica, además de a SCAF1 a otras proteínas de CIV. El CIV contiene varias isoformas específicas de tejido, COX7A1 y COX6A2 en corazón y músculo esquelético y COX7A2 y COX6A1 propias de hígado, aunque también presentes en corazón de roedores. SCAF1 presenta gran homología de secuencia con COX7A2, si bien posee un dominio extra, propuesto como responsable de interacción con CIII. Se considera que la interacción con CIV se haría por medio de la secuencia homóloga a COX7A2 (Cogliati et al 2016).

Según este modelo, COX7A2 presente en CIV monomérico de corazón e hígado, es reemplazado por SCAF1 cuando CIV es ensamblado en SCs. En el caso de que se presente la isoforma corta de SCAF1, incapaz de unirse a CIV, éste permanece unido a CIII. Estas observaciones podrían explicar por qué en ciertos modelos se puede interpretar SCAF1 como un interactor con CIII (Perez-Perez et al 2016) o una subunidad constituyente de CIV (Kezhong Zhang et al 2016). Por otro lado, el reemplazo de COX7A2 por COX7A1 y de COX6A1 por COX6A2 en la formación de dímeros de CIV, resulta coherente con la poca cantidad de CIV₂ presente en hígado (Cogliati et al 2016). Por último, la presencia de respirasoma en corazón de animales con isoforma corta de SCAF1, sugiere la existencia de dos tipos de respirasomas en función de que la interacción CIII₂-CIV vía SCAF1 sea o no posible (Cogliati, Calvo, et al 2016). Esta hipótesis correlaciona con la descripción de dos conformaciones de respirasoma descritas por crio-microscopía electrónica en función de la presencia o ausencia de interacción entre CIII₂ y CIV (Letts et al 2016).

III.3. Implicaciones funcionales de la organización en supercomplejos.

Aunque la existencia de SCs es ya ampliamente aceptada, en base a las evidencias hasta aquí expuestas; el debate sigue abierto en relación a su significado biológico y alcance funcional.

Existen aún cuestiones abiertas en torno al rol de los SCs. Por un lado, la primera función propuesta para estas asociaciones fue la de conferir una ventaja cinética en la transferencia de electrones, si bien otros autores se inclinan por considerarlos tan solo estructuras encargadas de la estabilización de los complejos individuales. No está claro tampoco qué proporción de los complejos se encuentran asociados en SCs, lo cual trae a colación las últimas de las cuestiones. ¿Son los SCs estructuras estáticas o asociaciones dinámicas capaces de disociarse y asociarse bajo ciertas condiciones o estímulos? (Genova and Lenaz 2013). El estudio de la naturaleza dinámica de la mETC se encuentra enmarcado dentro del modelo de organización, previamente expuesto, denominado “modelo de plasticidad”.

III.3.1. Funciones atribuidas a los supercomplejos respiratorios.

Canalización de sustrato.

La primera función propuesta para los SCs fue la de mejorar la catálisis de la secuencia de reacciones que tienen lugar entre los complejos respiratorios, por medio de la canalización de sustrato. La canalización de los transportadores móviles CoQ y Cit c dentro de SCs permitiría la transferencia directa de electrones (Schägger 2001).

La primera evidencia funcional de la asociación entre complejos respiratorios fue obtenida de análisis de control metabólico. Este análisis permite la medida del control ejercido por un paso enzimático individual en una ruta. En el caso en que enzimas individuales ejercieran diferente control en diferentes puntos de la ruta, el coeficiente de control de flujo (FCC) para cada una sería diferente y menor a 1, siendo la suma de todos ellos cercana a 1. Si los sustratos son canalizados sin abandonar el entorno proteico, cada componente ejercería el mismo control siendo el FCC para cada uno cercano a 1 y la suma de todos ellos mayor a 1. Con esta estrategia se obtuvieron evidencias de la canalización de sustrato entre CI y CIII y por tanto de su asociación funcional. Sin embargo los autores plantean que, aunque se considere la asociación entre CI y CIII, se estima que tan solo el 16% del CoQ estaría atrapado en SCs (Bianchi et al 2004). Por tanto, las evidencias cinéticas a favor de un comportamiento de CoQ como un único *pool* difusible en membrana, podrían deberse al gran porcentaje de CoQ libre en membrana (Estornell et al 1992, Schneider et al 1982). De hecho, se estima que al menos una parte de la CoQ debería ser difusible, ya que el CII mostró clara ausencia de canalización de sustrato hacia CIII (Bianchi et al 2004), lo cual es coherente con la falta de asociación de CII en SCs (Chaban et al 2014).

Respecto a la canalización de Cit c, del mismo estudio análisis de control metabólico se dedujo la ausencia de interacciones de CIV con otros complejos. Sin embargo los autores no descartan una posible canalización del Cit c entre CIII y CIV, dado que ésta podría estar enmascarada por el hecho de que tan sólo una pequeña porción de CIV se encuentra asociada en SCs (Bianchi et al 2004). Estudios de espectrofotometría mostraron, en células intactas de levadura, la existencia de dos tipos de Cit c en función de su cinética de oxidación. Se estimó que un 16% del Cit c se encontraba unido por interacciones moleculares al CIV. Sin embargo, los autores concluyeron que el Cit c no se encontraba

secuestrado en SCs, cuestionando la relevancia de las asociaciones entre complejos (Trouillard et al 2011). Un hipotético análisis de la influencia del desensamblaje de SCs sobre la doble cinética del Cit c, ayudaría a clarificar este punto (Enríquez 2016).

En cuanto a evidencias estructurales, las conclusiones en relación a la canalización de sustrato para CoQ y Cit c a partir de los recientes modelos de respirasoma publicados, son contradictorias (Letts et al 2016, Wu et al 2016). Sazanov y colaboradores interpretan que la distancia de en torno a 10 nm y la falta de barreras proteicas para la difusión entre sitios de unión de CoQ y entre sitios de unión de Cit c, no justifican la hipótesis de la canalización. Sugieren que la limitación cinética en el intercambio del *pool* de CoQ a alta tasa de respiración podría explicar las evidencias a favor de canalización de sustrato entre CI y CIII (Letts et al., 2016). Sin embargo, Yang y colaboradores consideran que el ambiente lipídico entre CI y CIII posee las propiedades para atrapar la CoQ en su interior y que los sitios de unión para Cit c son suficientemente cercanos para que la canalización pueda tener lugar (Wu et al., 2016). Otros investigadores ya plantearon canalización de Cit c a partir de observaciones estructurales. El diámetro de la molécula de Cit c es de 3,4 nm, por lo que la distancia entre sus sitios de unión es de tan solo 3 veces su diámetro, en un entorno en el que la disposición de dominios proteicos y la carga negativa de las moléculas de cardiolipina también podrían facilitar esa canalización (Althoff et al 2011).

Limitación de la producción de especies reactivas de oxígeno.

La hipótesis de que el ensamblaje en SCs es capaz de limitar la producción de ROS en la mETC, ha sido planteada a partir de evidencias indirectas. Ha sido postulado que esta limitación se debe al mantenimiento de los componentes redox de los complejos en estado oxidado (Panov et al 2007) y al facilitamiento de la transferencia de electrones por canalización de sustrato (Seelert et al 2009). El primer estudio, capaz de demostrar que la pérdida de la organización en SCs incrementa la producción de ROS específicamente por CI, hizo uso de dos sistemas experimentales. Por un lado, el tratamiento con detergente de proteoliposomas y mitocondrias para disociar SCs y, por otro, la generación de proteoliposomas con CI y CIII en los que es posible modular la asociación de los complejos en función del ratio lípido:proteína utilizado. En todos los modelos se observó un incremento en la producción de ROS al disociarse CI de SCs, sin pérdida importante de la actividad de dicho complejo. Los autores plantean que, dentro de una visión dinámica de la mETC, el control de la producción de ROS cobraría sentido, pudiendo actuar éstos como señalizadores redox (Maranzana et al 2013).

La conexión entre la disociación de SCs y el incremento en la producción de ROS se ha observado en varios modelos celulares y animales. La expresión de la forma activada del oncogen K-ras en fibroblastos de ratón produjo una fuerte caída de la SCs que contenían CI, unido a un gran incremento en la producción de ROS (Baracca et al 2010). En el caso de *S. cerevisiae* carente de Rcf1, la pérdida de asociación entre CIII y CIV produjo un incremento de ROS que fue vinculado a la liberación de CIII de SCs (Yu Chan Chen et al 2012, Vukotic et al 2012). También en levadura, la mutación del gen Tafazzin que en humanos produce el Síndrome de Barth, caracterizado por la incapacidad de remodelación de cardiolipina y consecuente disociación de SCs, produjo un gran incremento en la producción de ROS (Shuliang Chen et al 2008).

La pérdida de asociación en SCs ha sido relacionada con envejecimiento. Un estudio en cortex de rata mostró una caída del 40% de los SCs en que CI está presente (Frenzel et al 2010). También, asociada a la edad, se vio la disminución de SCs en mitocondria de corazón de rata, sin variación de la cantidad de complejos individuales (Gómez et al 2009).

Esta disociación de SCs se supone importante para el desarrollo del fenotipo mitocondrial asociado a la edad, que presenta disminución de la capacidad energética mitocondrial y aumento en producción de ROS. Sin embargo más estudios serán necesarios para establecer si existe relación causal entre estos fenómenos y en qué sentido (Gómez and Hagen 2012).

Un reciente estudio ha establecido relación entre el ensamblaje de CI en SCs y la disminución en la producción de ROS en un modelo fisiológico. Neuronas y astrocitos presentan diferencias metabólicas, siendo las primeras mucho más dependientes de OXPHOS para obtener energía. Las neuronas presentan un CI predominantemente ensamblado en SCs, mientras que los astrocitos presentan mayor abundancia de CI libre y, en consecuencia, mayor producción de ROS. La proteína de CI, NDUFS1, necesaria para la asociación de CI en SCs se encuentra en mayor cantidad en neuronas. Su sobreexpresión en astrocitos promueve la incorporación de CI en SCs disminuyendo la producción de ROS (Lopez-Fabuel et al 2016).

Estabilidad y actividad de los complejos respiratorios.

Los análisis de la organización de la mETC en pacientes con deficiencia en CIII (Schägger et al 2004) y en cultivos celulares de fibroblastos murinos con falta de CIII, CIV o Cit c sugieren que la estabilidad de CI es dependiente de la presencia de esos otros tres componentes y de su ensamblaje en SCs (Acín-Pérez et al 2004, Diaz et al 2006, Vempati et al 2009). Deficiencias combinadas de CI/CIII y CI/CIV han sido descrita en pacientes. Mutaciones patológicas en subunidades o factores de ensamblaje de CIII conducen a deficiencias secundarias de CI y CIV (Fernandez-Vizarra et al 2007, Lamantea et al 2002, Morán et al 2010) y mutaciones en subunidades de CIV pueden conducir a deficiencias de CI (D'Aurelio et al 2006). Si bien son numerosos los estudios que relacionan la dependencia de CI por otros componentes de la cadena, también ha sido descrito el fenómeno inverso. Mutaciones en genes que producían deficiencia específica de CI, pueden producir disminución de la cantidad de CIII o CIV (Budde et al 2000, Saada et al 2012, Ugalde et al 2004).

La capacidad de los SCs para estabilizar CI quedó puesta de manifiesto también, en ratones *knock out* para la subunidad accesoria de CI, NDUFS4. Aunque la disminución en estabilidad y función de CI es muy grande, un CI parcial es estabilizado en SCs (Calvaruso et al 2012).

La interacción física en SCs se ha considerado hasta ahora la causa de la estabilidad de los complejos respiratorios, principalmente de CI. Sin embargo un estudio en fibroblastos de ratón carentes de CIII funcional propone el incremento en la producción de ROS como responsable de la desestabilización de SCs y de la degradación de unos complejos en respuesta a la deficiencia en otros (Diaz et al 2012).

La asociación de complejos en SCs fue propuesto como paso necesario para que la respiración tenga lugar. Se realizó un estudio de complementación de DNA mitocondrial, por fusión de células con mutaciones homoplásmicas, unas en CIII y otras en CIV. A partir de la recuperación de una cantidad funcional mínima de CIII y CIV, el incremento en la respiración celular correlacionaba con la presencia de SCs (D'Aurelio et al 2006).

Estudios en *C. Elegans* mostraron que, no sólo la estabilidad, sino también la actividad de CI resultaba dependiente de su ensamblaje en SCs. Dos mutantes diferentes, con menor cantidad de CIV, presentaron menor actividad de CI debida a la disociación de SCs, sin variación en la cantidad de CI (Suthammarak et al 2009). El análisis de mutantes de CIII

mostró diferentes mecanismos por los cuales una deficiencia en CIII podría inhibir la actividad de CI. El mutante *ctb-1* inhibía la actividad de CI en respirasoma, probablemente debilitando la interacción de CIV en SCs. El mutante *isp-1* presentaba disminución en la cantidad total de CI, mientras que el doble mutante *isp-1;ctb-1* vio afectado el ensamblaje de CI en respirasoma (Suthammarak et al 2010).

III.3.2. Plasticidad de la cadena de transporte electrónico.

El modelo de organización de la mETC denominado “modelo plástico”, considera que tanto las asociaciones entre complejos como los complejos libres, visualizados tras purificación y permeabilización de membranas mitocondriales, son funcionales. Es capaz de aunar, por tanto, evidencias estructurales a favor del modelo sólido y del fluido (Acín-Pérez et al 2008). A nivel funcional, este modelo va más allá de la confirmación de funciones atribuidas a SCs, la mayoría coherentes con el “modelo sólido”. El modelo de plasticidad prevé que la estructura de la mETC es capaz de adaptarse, asociando y disociando complejos en respuesta a estímulos.

Evidencias estructurales.

Existen evidencias indirectas de que la organización en SCs es capaz de variar en el transcurso de fenómenos fisiológicos. Incremento en el ensamblaje en SCs fue descrito en la diferenciación de células madre mesenquimales a adipocitos (Hofmann et al 2012) y durante el desarrollo cardíaco en embriones entre día 9.5 y día 11.5 (Beutner et al 2014). La disociación de SCs en cerebro y corazón, se ha correlacionado con el desarrollo de fenotipo mitocondrial asociado a envejecimiento (Frenzel et al 2010, Gómez et al 2009). Otros procesos en que se ha descrito reconfiguración de SCs recientemente son el ayuno en hígado de ratón (Lapiente-Brun et al 2013), ejercicio en músculo esquelético humano (Greggio et al 2016) y activación de macrófagos (Garaude et al 2016).

Una disminución del ensamblaje en SCs ha sido caracterizado en patologías como fallo cardíaco (Rosca et al 2008) y diabetes (Antoun et al 2015). Sin embargo, más estudios son necesarios para discernir entre daño secundario y adaptación de la mETC.

Otro proceso observado y predicho por el “modelo plástico” es la diferente organización de los complejos respiratorios según tipo celular, en relación a diferencias metabólicas, como en el caso de neuronas y astrocitos (Lopez-Fabuel et al 2016) (detallado en el apartado *Limitación de la producción de especies reactivas de oxígeno*).

Regulación de plasticidad.

El estudio de los factores y procesos capaces de regular la asociación entre complejos respiratorios es esencial para el entendimiento de la dinámica de la mETC. El conocimiento de esos elementos permitiría además modular el nivel de SCs para el análisis de su fisiología o como terapia (Porrás and Bai 2015). El uso de compuestos capaces de disociar SCs en células cancerígenas ya ha sido testado en células Her2, las cuales presentan incremento en ensamblaje de SCs y respiración por CI (Rohlenova et al 2017).

Al margen del factor de ensamblaje SCAF1 (previamente detallado en el apartado *Factores de ensamblaje*) son pocos los elementos reguladores de ensamblaje de SCs descritos. La proteína MCJ/DnaJC15, interacciona preferentemente con CI disminuyendo su actividad, la formación de SCs, el potencial de membrana y la producción de ATP. Su ausencia previene la acumulación de lípidos en hígado en respuesta a ayuno o dieta alta en

colesterol, tratándose por tanto de una posible diana terapéutica (Hatle et al 2013). A nivel de modificaciones postraduccionales, la fosforilación de CIV se mostró capaz de limitar la incorporación del complejo en SCs en un modelo de fallo cardíaco (Mariana Rosca et al 2011).

Ciertos elementos implicados en la estabilidad de SCs han sido postulados también como posibles reguladores de la dinámica de la mETC. Es el caso del potencial de membrana mitocondrial y de la estabilidad de crestas mitocondriales mediada por OPA1 (ver apartado *Factores no proteicos implicados en estabilidad de SCs*). Se ha sugerido que un alto potencial de membrana podría indicar una baja demanda energética por parte de la célula, de modo que los SCs serían desensamblados en sus componentes individuales para disminuir el consumo de oxígeno (Quarato et al 2011). Por otro lado, se postuló que la adaptación a situaciones de menor eficiencia en la producción de ATP podría darse vía regulación de dinámica mitocondrial. En el caso de neuronas expuestas a hipoxia, el incremento en la estabilidad de SCs y respiración máxima se produjo vía incremento en oligomerización de OPA1, mediada por la acidosis extracelular derivada de la disminución de oxígeno disponible (Khacho et al 2014).

Plasticidad y regulación de metabolismo.

En un reciente trabajo, se ha propuesto un modelo de plasticidad según el cual la mETC es capaz de reestructurarse para optimizar el uso de diferentes sustratos. Experimentos de modulación de la interacción entre complejos han evidenciado segmentación de la mETC a dos niveles (Lapiente-Brun et al 2013).

En primer lugar, la unión de CIII a CI, y su falta de asociación con CII y otras enzimas dependientes de FAD, generan dos *pools* de CoQ funcionalmente separados. Uno se encuentra dedicado a electrones procedentes de NADH (CoQ_{NADH}) y otro a electrones procedentes de FADH_2 (CoQ_{FAD}). Dado que diferentes sustratos generan diferentes proporciones de NADH y FADH_2 , una adaptación a uno u otro sustrato supone la reestructuración de la cadena para incrementar el flujo por una u otra vía. A efectos físicos esto se materializa en la liberación de CIII de su asociación con CI ante el incremento en FADH_2 . Este efecto fue observado en mitocondrias de hígado de animales en ayuno (Lapiente-Brun et al 2013).

En segundo lugar, la presencia o ausencia de unión entre CIII y CIV determinada por la presencia o ausencia de la forma funcional del factor de ensamblaje SCAF1, determina tres poblaciones diferentes de CIV. Un CIV dedicado a los electrones procedentes de NADH (asociado en respirasoma), un CIV dedicado exclusivamente a electrones procedentes de FADH_2 (asociado en $\text{III}_2\text{+IV}$) y un CIV libre capaz de recibir electrones de ambos. Esta observación implica una segmentación del *pool* de Cit c (Lapiente-Brun et al 2013). La ausencia de SCAF1 impide, por tanto, la segmentación a nivel de Citc. Por tanto, y como muestran los análisis de respiración y actividad enzimática, SCAF1 minimiza la competencia entre sustratos por el uso de la mETC. En ratones sin SCAF1 funcional un solo sustrato es capaz de saturar toda la mETC, mientras que en ratones con SCAF1 la adaptación a uno u otro sustrato debe realizarse de forma controlada mediante la liberación de CIII de su asociación en SCs (Lapiente-Brun et al 2013) (**Figura III.5**).

Este modelo encuentra su principal limitación para ser totalmente aceptado en la convicción de algunos autores de que tanto CoQ como Cit c se organizan como un único *pool* homogéneo sin segmentación (Blaza et al 2014). Sin embargo, la coexistencia de dos *pools* de CoQ, ya fue propuesta previamente para aunar evidencias a favor de canalización

de sustrato y de difusión en membrana (Bianchi et al 2004). Análisis en mitocondria aislada mostraron que cada sustrato, succinato o NADH, tan solo puede reducir una fracción limitada del *pool* de CoQ (Lass and Sohal 1999). Estudios de respiración dependiente de succinato arrojaron el dato de que tan sólo el 21% de la CoQ total en mitocondria de hígado y el 79% de músculo son utilizables vía succinato (Benard et al 2008).

Un reciente estudio de Hirst y colaboradores concluye, sin embargo, que el *pool* de CoQ no presenta partición para diferentes vías de transferencia de electrones, en línea con el “modelo fluido” (Blaza et al 2014). Sin embargo, otros autores han reinterpretado algunos resultados de dicho trabajo afirmando que éstos no pueden explicarse ni dentro de un modelo puro con un solo *pool* de CoQ, ni en un modelo puro con dos *pools* independientes. El hecho de que el grado de reducción del CIII sea mayor cuando se añade NADH y succinato simultáneamente; pero no igual a la suma de las reacciones de cada sustrato por separado; sólo podría entenderse dentro del modelo plástico en el cual la interdependencia entre *pools* es incompleta (Enríquez 2016). Este es, por tanto, otro aspecto en continuo debate.

Se han descrito dos tipos de Cit c en función de su cinética de oxidación. Sin embargo, los autores del trabajo enmarcan los resultados dentro de un modelo de *pool* único difusible en membrana (Trouillard et al 2011). En la actualidad, la canalización total o parcial del Cit c, se encuentra en cuestión (Porras and Bai 2015).

El estudio de los mecanismos que median la adaptación de la mETC, liberación de CIII de su unión en SCs y regulación de la función de SCAF1, son esenciales para el total entendimiento de las implicaciones y alcance de los fenómenos descritos en relación a la naturaleza dinámica de la mETC.

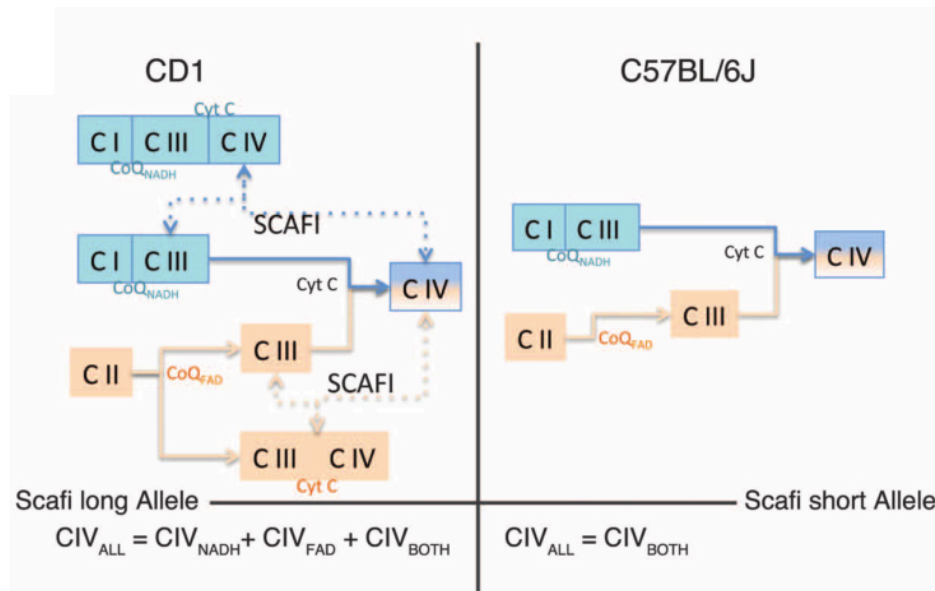


Figura III.5. Modelo plástico en presencia y ausencia del factor de ensamblaje de supercomplejos SCAF1. El flujo de electrones, en la cadena de transporte, es dirigido en función de las asociaciones presentes entre complejos respiratorios. Las asociaciones de CI en SCs (I+III₂ y I+III₂+IV) definen un *pool* de CoQ (CoQ_{NADH}) dedicado a electrones provenientes del CI. El resto del CoQ se encuentra libre para tomar los electrones de CII (CoQ_{FAD}). Por otro lado, la existencia de asociación entre CIII₂ y CIV define tres poblaciones diferentes de CIV, en función de que éste reciba electrones provenientes de CoQ_{NADH}, de CoQ_{FAD} o de ambos. En una situación normal, en que se exprese el alelo largo de SCAF1, el flujo de electrones se encuentra segmentado, de manera que un solo sustrato no podría saturar la cadena de transporte. En el caso de que se exprese la forma corta de SCAF1 (presente en líneas de ratón usualmente utilizadas en laboratorio), la falta de asociación de CIV permite el uso de toda la cadena desde una sola entrada de electrones, desregulando el proceso (Lapiente-Brun et al 2013).

Objetivos

La estructura de la cadena de transporte electrónico mitocondrial ha sido objeto de debate por varias décadas. La aceptación de la existencia de supercomplejos respiratorios es un hecho reciente que tiene grandes implicaciones para el entendimiento de la fisiología mitocondrial y la patogenia de enfermedades asociadas al sistema OXPHOS.

Nuestro grupo propuso en el año 2008 el “modelo plástico”, que más allá de plantear la convivencia de SCs y complejos aislados, proponía que esa estructura responde a una naturaleza dinámica. Los componentes de la cadena serían capaces de adaptar sus asociaciones en respuesta a estímulos, probablemente de índole metabólica, para regular el flujo de electrones y la producción de especies reactivas de oxígeno (Acín-Pérez et al 2008).

Esta hipótesis fue corroborada posteriormente, con la demostración de la adaptación de la cadena en respuesta al cambio de sustrato. Diferentes sustratos generan diferentes proporciones de NADH y FADH₂ en su oxidación. Ya que NADH aporta electrones a CI asociado en SCs (I+III₂ o I+III₂+IV), mientras que FADH₂ los aporta a otras enzimas libres en membrana como CII, la asociación y disociación de SCs permite optimizar la entrada de electrones por una u otra fuente (Lapiente-Brun et al 2013).

El mecanismo que media la disociación de SCs en estas circunstancias no ha sido descrito. Sí se conoce el hecho de que el CIII une preferencialmente CI, de manera que en situaciones en que CI es disminuido, el CIII liberado es utilizado para la respiración a partir de otras enzimas como CII. Por otro lado, ha sido descrita la disminución de CI con incremento de respiración por succinato en mitocondrias de hígado de animales en ayuno, forzados al uso de ácidos grasos (Lapiente-Brun et al 2013). Por tanto, nuestra hipótesis es que existe un mecanismo capaz de degradar CI, liberando CIII de su asociación en SCs, permitiendo su uso por otras enzimas dependientes de FAD, en situaciones en que, como durante el uso de ácidos grasos como sustrato, ha de optimizarse la entrada de electrones a partir de FADH₂.

Otro aspecto de gran importancia en aquel trabajo, fue el descubrimiento del primer factor de ensamblaje de SCs denominado SCAF1, responsable de la asociación entre CIII y CIV. El estudio de animales carentes de SCAF1 funcional, permitió demostrar cómo esta asociación define diferentes vías de flujo de electrones previniendo la saturación de la cadena con un solo sustrato (Lapiente-Brun et al 2013). El hecho de que animales que presentan la mutación de un factor de ensamblaje de SCs sean sanos y fértiles, implica que el conocimiento de su actividad y regulación serán muy importantes para el entendimiento de la plasticidad del sistema OXPHOS. La búsqueda de nuevos factores de ensamblaje y proteínas reguladoras de la función de SCs es esencial, para el entendimiento de la dinámica y plasticidad del sistema, y podrían resultar herramientas útiles para modular su estructura y actividad.

El objetivo general de esta tesis doctoral es investigar los mecanismos y factores responsables de la plasticidad estructural y funcional de la cadena de transporte. Los objetivos concretos propuestos son los siguientes:

1. Estudio del mecanismo responsable de la optimización de la entrada de electrones a la cadena de transporte.
2. Búsqueda de factores implicados en la regulación estructural y funcional de los supercomplejos respiratorios.

Materiales y métodos

I. CULTIVOS CELULARES.

I.1. Líneas celulares.

A continuación, se muestran las líneas celulares utilizadas en este trabajo.

Tabla 1. Líneas celulares utilizadas y características de interés

Línea	nDNA	mtDNA	Mutación	mETC	Origen	Referencia
C_b	L929	L929	<i>mt-Col</i> T6589C (homoplasma)	Complejos estables	Línea derivada de L929.	(Acín-Pérez et al 2004)
Cytb^{KO}			<i>mt-cytb</i> G15263A <i>mt-Col</i> T6589C (homoplasma)	Carencia de CIII y gran disminución de CI	Mutagénesis aleatoria en L929 y transferencia a nueva L929	
C₁₀	C57BL/6 y 129/SvJ	C57BL/6	-	Complejos estables	Fibroblastos de piel de ratón	(Díaz et al., 2006)
Cox10^{KO}			<i>Cox10</i> <i>Knock out</i> (homocigosis)	Carencia de CIV y CI	Expresión Cre en fibroblastos <i>Cox10^{flax/flax}</i>	
C_c	C57BL/6	C57BL/6	-	Complejos estables	Fibroblastos de pulmón de ratón	(Vempati et al 2007)
Cytc^{KO}			<i>Cytc</i> somático y testicular <i>Knock out</i> (homocigosis)	Carencia de Citc, CIV y CI	Expresión Cre en fibroblastos con <i>Cyt c_s^{-/-} Cyt c_t^{-/-}</i> y trasgén <i>Cytc^{flax/0}</i>	
FC57	L929	C57BL/6	-	Complejos estables	Cíbridos generados por transferencia de plaquetas C57BL/6 a ρ^{0929}	(Moreno-Loshuertos et al 2006)
ρ^{0929}	L929	No mtDNA	-	Carencia de CI, CIII, CIV y CV	Depleción de mtDNA en L929	
ND4^{KO}	L929	3T3	<i>mt-nd4</i> 10227delA (homoplasma)	Carencia de CI	Mutagénesis aleatoria en 3T3 y transferencia a L929	(Perales-Clemente et al 2010)

La expresión exógena de proteínas AOX, SOD2, EXTL1HA, EXTL1X1 y EXTL1X1HA, se indica con el nombre de la proteína añadido al tipo celular. Cuando la célula fue transfectada, como control, con vector sin secuencia codificante a expresar, se indica “e:v” (*empty vector*) o “puro R”, dado que el vector de transfección posee el gen de selección de resistencia a puromicina.

I.2. Medios de cultivo.

1) El medio utilizado para el cultivo de todas las líneas celulares fue medio DEMEM (Sigma D5796) con L-glutamina y alta concentración de glucosa (25mM), al que se añadió 5% de suero fetal bovino (Sigma F7524), 1mM de piruvato sódico (Lonza), 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de sulfato de estreptomicina (Lonza).

Sobre esta base, a la que denominamos medio completo, se incorporaron variables en función de ciertas características específicas del tipo celular. Las líneas celulares con deficiencia que dificultara la normal óxido-reducción de la coenzima Q (Cytb^{KO}, Cox10^{KO}, CytC^{KO} y p⁰⁹²⁹) fueron cultivadas con un suplemento de uridina (50 µg/ml), para compensar el fallo en la actividad de la dihidroorotato deshidrogenasa implicada en su síntesis. Las líneas celulares mutantes que expresaban AOX (Cytb^{KO}AOX, Cox10^{KO}AOX y CytC^{KO}AOX) fueron cultivadas en medio con suero fetal bovino dializado, para retirar la uridina y ejercer presión selectiva. De este modo, se evita la reversión al fenotipo uridina-dependiente de las células mutantes.

2) Para el cultivo de células con sustratos diferentes a la glucosa, se preparó medio libre de azúcares (Sigma D5030), suplementado con 2mM L-glutamina, 5% suero fetal dializado, rojo fenol, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de sulfato de estreptomicina (Lonza), como base sobre la que añadir el sustrato elegido: 5mM glucosa, 5mM galactosa, 1mg/ml de suero bovino enriquecido en ácidos grasos AlbumMAX® (GIBCO) con 0,5mM de hidrocloreto de L-carnitina o una mezcla de 5mM de acetoacetato de litio con 5mM de D-β-hidroxibutirato de sodio.

3) Para los experimentos de marcaje de proteínas codificadas en mtDNA (sección IV.3) se utilizó medio libre de metionina y cisteína (GIBCO 21013-024) suplementado con 2 mM L-glutamina, 5% de suero fetal bovino (Sigma F7524), 1mM de piruvato sódico (Lonza), 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de sulfato de estreptomicina (Lonza).

I.3. Condiciones de cultivo.

Las células fueron cultivadas a 37°C en una atmósfera 5%CO₂/95% aire. En el caso de experimentos de cultivo en hipoxia, las células fueron incubadas en cámara de hipoxia (Ruskin) con una atmósfera 5%CO₂/1%O₂/N₂balanceado.

El medio fue cambiado de rutina cada 48 horas. En el caso de que se realizara tratamiento con algún compuesto (rotenona, piericidina A, DPI, antimicina, azida) o cambio de sustrato el medio fue cambiado a diario.

I.4. Curvas de crecimiento

Para determinar las concentraciones a las que utilizar los inhibidores de complejos respiratorios, se realizaron curvas de crecimiento glucosa/galactosa. Dado que células con deficiencia en la función respiratoria no son capaces de crecer en medio con galactosa como sustrato, es posible calcular la concentración a la que un compuesto es capaz de inhibir un complejo respiratorio en función de la mortalidad en galactosa. Al mismo tiempo, un duplicado, con las mismas concentraciones de inhibidor a testar, pero con medio con glucosa, permite testar la toxicidad en glucosa por efectos diferentes a la inhibición de la mETC.

El análisis se realizó en placas P96 en las que se evaluaron diferentes concentraciones de inhibidor, en glucosa y galactosa. Se sembraron tantas placas como días en que se quiso hacer el seguimiento. Cada día se estimó la cantidad de células en cada condición, con el ensayo de proliferación celular CyQUANT™ (ThermoFisher), que permite la medida del contenido de ADN por fluorescencia.

I.5. Generación de líneas con sobreexpresión de proteína de interés.

La sobreexpresión proteica fue realizada por medio de transfección lentiviral.

En primer lugar, se generaron las partículas lentivirales necesarias para la transfección con el plásmido de expresión, en células empaquetadoras 293T. Una vez recogidas y cuantificadas las partículas generadas, se realizó la transfección en las células de interés.

Para ello dos millones de células 293 T fueron sembradas en placa de P100. Al día siguiente, tras preincubación de 1 hora con cloroquina 25 μ M, y posterior incubación en medio normal por otra hora más, la transfección se realizó con el agente de transfección no liposomal X-treme-GENE-HP (Roche). Sobre 2ml de medio libre de suero (100 μ l / μ g de DNA) se añadieron 10 μ g del vector de transferencia (pWPXLdirespR con la secuencia codificante del gen a expresar), 7 μ g del vector para la cápside y polimerasa viral (psPAX2) y 3 μ g de vector para la envuelta (pMD2G). Tras mezclar, se incubó 15 minutos a temperatura ambiente y después se añadió gota a gota sobre el medio de cultivo de las células 293T. Pasadas 8-16 horas el medio fue cambiado por medio fresco para retirar los restos de X-treme-GENE. Las características de los plásmidos transfectados se muestran en la sección XII. *Plásmidos*.

Las partículas virales fueron recogidas 48 horas tras la transfección. Se recogió el medio de cultivo, se centrifugó y se filtró con filtro de 0,45 μ m para evitar la contaminación de las células de interés con células 293T. Los virus fueron alicuotados en viales de 1 ml y congelados a -80°C. Un pequeño volumen fue utilizado para la titulación por RT-PCR (Scherr et al 2001) (sección IX.1. *Ensayo de cuantificación absoluta*) con el fin de poder transfectar con todos los vectores y en todos los tipos celulares con una misma dosis viral. En general, la transfección se realiza a tres MOI (*multiplicity infection*) diferentes. La MOI es la relación entre el número de partículas virales añadidas y el número de células diana. De este modo, tras la selección, se elige para todas las células de un mismo experimento, aquellas transfectadas a la menor MOI en que se consiguió un buen rendimiento.

Las células de interés fueron entonces transfectadas con diferentes MOIs. Para ello las células fueron sembradas en su medio habitual 24 horas antes de la transfección. En el momento de la transfección el medio habitual fue cambiado por la mínima cantidad de medio capaz de cubrir las células (1ml en el caso de placa de 6 pocillos) sin suero fetal ni antibiótico y con polibreno 8 μ g/ml. Se añadieron las dosis de virus correspondientes a MOI 1, 5 o 10. Tras 6 horas, se añadió medio completo hasta llegar al volumen habitual.

Dado que el plásmido utilizado posee gen de selección de resistencia a puromicina, a las 48 horas se comenzó el tratamiento con la mínima dosis de puromicina que resultara tóxica en cada tipo celular, evaluada previamente. En paralelo se trató con puromicina un control de respuesta a antibiótico, células no transfectadas con virus, para saber en qué momento la selección es lo suficientemente avanzada como para proceder a testar la sobreexpresión en nuestras células.

II. MODELOS ANIMALES.

Los tejidos utilizados han sido obtenidos tras el sacrificio de los ratones machos adultos procedentes de la Unidad de Medicina Comparada del CNIC. Fueron mantenidos de acuerdo a la legislación (Real Decreto 1201/2005 y Ley 32/2007) y bajo las recomendaciones para cuidado de animales para experimentación y fines científicos de la Comisión del consejo de Europa.

Dado que los experimentos que incluyen tejido animal siempre han implicado condiciones fisiológicas control, se han utilizado ratones CD1 (laboratorios Harlan) por presentar la forma funcional del factor de ensamblaje de supercomplejos, SCAF1. Otras líneas de animales usualmente utilizadas en laboratorio presentan una forma más corta no funcional (Lapiente-Brun et al 2013).

III. BIOLOGÍA MOLECULAR.

III.1 Diseño de secuencias.

El diseño de las secuencias codificantes para su posterior síntesis, por la empresa *GenScript*, se realizó tomando la secuencia codificante (CDS) para la proteína de interés, de la base de datos CCDS Database de NCBI o deduciéndolos a partir de las secuencias de mRNAs predichos con herramientas bioinformáticas, en el caso de las hipotéticas variantes de EXTL1.

Algunas variaciones fueron añadidas a las secuencias con diferentes propósitos. La secuencia de la oxidasa alternativa AOX de *Emericella nidulans*, clonada previamente en el laboratorio, por la Dra. Ester Perales, se encuentra adaptada al *codon bias* de ratón. Al resto de secuencias se añadió a la secuencia codificante, la secuencia Kozac, que facilita el reconocimiento de la secuencia de iniciación durante el proceso de traducción en células eucariotas. En los casos en que la secuencia codificante para el epítipo HA fue añadida, se hizo en el extremo C-terminal. También fueron añadidas las secuencias diana para las enzimas de restricción, necesarias para su inclusión en los vectores pWPXLd irespR (PmeI y BamHI) y pTNT (EcoRI y KpnI).

Las secuencias codificantes, mostradas en la sección XI. *Secuencias codificantes*, poseen algunos nucleótidos diferentes a la secuencia original (indicados en rojo). Los cambios introducidos, que no generan cambio en la secuencia aminoacídica, han sido realizados para evitar el corte por una enzima de restricción o para variar secuencias dianas para RNAs interferentes diseñados previamente (los experimentos de interferencia no han sido finalmente introducidos en esta tesis).

III.2. Clonación de plásmidos en bacterias.

La obtención de grandes cantidades de plásmido se realiza por clonación de éste en bacterias.

Para ello, 25 µl de bacterias competentes DH5α fueron transformadas con 20 ng del plásmido de interés por choque térmico. Tras la adición del DNA, la mezcla se incubó 30 minutos en hielo, para luego exponerla 30 segundos a 42°C y otros 3 minutos a hielo. A continuación, se añadieron 900 µl de medio SOC (triptona 20g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 8,55 mM, KCl 0,25M, MgCl₂ 2M) y se incubó a 37°C durante una hora. Sobre una placa precalentada de medio LB-agar con el antibiótico de selección, se sembraron 200 µl de bacterias, las cuales fueron incubadas toda la noche a 37°C para obtener colonias.

La obtención del plásmido a partir de las colonias se realizó cultivando una pequeña porción de la colonia de interés en LB líquido con el antibiótico de selección (100 µg/ml en caso de ampicilina). Tras 14-16 horas, las bacterias fueron lisadas y el plásmido extraído por medio de *kits* comerciales de purificación de DNA. Si se trataba de purificar tan solo una pequeña cantidad para su secuenciación (servicio prestado por la empresa Secugen) se partía de unos 25 ml de bacterias y el DNA se extraía con el kit *Nucleo Spin Plasmid Easy Pure* (Qiagen). Para la obtención de mayor cantidad de plásmido, se partía de 200-300 ml y la extracción se realizaba con el *QIAGEN Plasmid Maxi Kit*.

Para cuantificar y determinar la pureza del plásmido obtenido, se realizó la medida de absorbancia 260 nm, así como de las ratios 260/280 y 260/230. por medio del espectrofotómetro NanoDrop®.

III.3. Digestión de plásmidos.

La digestión de plásmidos con enzimas de restricción se realizó en los casos en que quisiera liberarse un inserto contenido en un plásmido, generar sitios de restricción en un plásmido para la posterior ligación de un inserto o testar la incorporación de un inserto en un vector ya ligado.

La reacción con enzimas de digestión se llevó a cabo según las especificaciones del fabricante (New England Biolabs), existiendo variaciones en las condiciones en función de las enzimas utilizadas. Sólo en el caso de que la digestión se realizara sobre un plásmido con el propósito de generar sitios de restricción sobre los que posteriormente ligar un inserto, se realizó defosforilación de los extremos libres de DNA. Para ello, una vez finalizada la digestión, se añadió 1 unidad de fosfatasa alcalina (Invitrogen) por reacción y se incubó 30 minutos a 37°C.

III.4. Electroforesis y extracción de DNA.

La electroforesis de DNA se realizó en gel horizontal de agarosa de 1-2% en TAE 1X con 5 µg/ml de bromuro de etidio, en función del tamaño de los fragmentos a resolver.

En los casos en que la electroforesis se realizó para obtener plásmido digerido o inserto de interés para ser ligado en otro vector, las bandas debían ser extraídas del gel. Para ello la banda que contenía el DNA de interés fue visualizada con un transiluminador de luz ultravioleta y escindida del gel. La elución del gel se realizó con el *kit* comercial *QiAquick Gel Extraction* (Qiagen), según especificaciones del fabricante.

III.5. Ligación de insertos en un nuevo plásmido.

La reacción de ligación de un inserto de interés, en un plásmido diferente al de origen, se realizó con la enzima T4DNA ligasa (Promega). La relación entre la cantidad de inserto y vector añadido, en la reacción, fue de 3:1 o 6:1, según eficiencia de la reacción. La cantidad de inserto a añadir se calcula con la siguiente fórmula:

$$(\text{ng de vector} \times \text{kb de inserto} / \text{kb de vector}) \times \text{ratio inserto:vector} = \text{ng de inserto}.$$

La mezcla de reacción, con T4 ligasa y su buffer comercial, se llevó a cabo según especificaciones del fabricante a 4 °C durante 14- 16 horas. Una vez terminada la reacción de ligación, se procedió a la clonación en bacterias (sección III.2).

III.6. Conservación de colonias.

Las bacterias que fueron transformadas con plásmido de interés, se congelaron y conservaron a -80°C. Para ello, sobre 700 µl de mezcla de cultivo fresco realizado a partir de una colonia, se añadieron 300 µl de glicerol 50%. En el caso de precisar el plásmido contenido en esas bacterias, se inoculó una gota de la mezcla congelada sobre LB líquido con el antibiótico de selección y se extrajo DNA.

IV. EXTRACCIÓN Y RESOLUCIÓN DE MUESTRAS PROTEICAS.

IV.1 Extracción de proteínas.

La extracción de proteínas se realizó con tampón RIPA (Tris-HCl 50mM pH 7,4, NaCl 50mM, Triton X-100 1%, deoxicolato de sodio 0,5%, EDTA 5 mM) esterilizado al que se añadieron inhibidores de proteasas (pepstatina 1ug/ml, leupeptina 1 ug/ml, aprotinina 1 ug/ml y PMSF 1mM).

El pellet celular obtenido a partir de una placa P100 al 80% de confluencia fue incubado con 200 µl de tampón RIPA durante 15 minutos a 4°C en rueda giratoria. Posteriormente se centrifugó a máxima velocidad en microfuga durante 15 minutos a 4°C y se conservó el sobrenadante.

IV.2 Cuantificación de proteínas.

Las proteínas de cultivo celular extraídas por RIPA y las proteínas de mitocondria tras aislamiento, fueron cuantificadas por método de Bradford (Bradford 1976).

En placa P96 se colocaron 200 µl de agua mili-Q por pocillo. Por un lado, se generó una curva patrón con concentraciones conocidas de BSA (con 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 µl de una solución 1mg /ml) y por otro se sembró por triplicado 1µl de cada muestra. A continuación, se añadieron 50 µl de reactivo de Bradford (Bio-Rad) y tras desarrollarse la reacción por al menos 5 minutos, se midió la absorbancia a 595 nm. La concentración de proteínas en las muestras se dedujo a partir de la recta patrón de BSA.

IV.3. Síntesis de proteínas *in vivo*.

El análisis de la estabilidad de los complejos respiratorios se realizó marcando radioactivamente las subunidades codificadas en el mtDNA. Es posible marcar específicamente estas proteínas alternando el uso de inhibidores de la traducción de proteínas específicos para ribosomas mitocondriales o ribosomas citosólicos (Chomyn 1996).

El día anterior al experimento se sembró una placa de cultivo de 100 mm con las células suficientes para alcanzar un 80% de confluencia al inicio del experimento (según tipo celular).

El primer día de experimento se realizó la inhibición de la síntesis de proteínas codificadas en mtDNA con el inhibidor reversible cloranfenicol (CAP), el cual une la fracción ribosomal 50S del ribosoma mitocondrial. El medio de cultivo completo fue sustituido por medio completo con uridina 50 µg/ml y CAP 40 mg/ml, con el que las células fueron incubadas durante 24 horas.

El segundo día se retiró el medio con CAP, se hicieron varios lavados con PBS para retirar los restos de inhibidor y se añadió durante media hora medio completo con uridina 50 µg/ml.

En este momento, tras el tratamiento con CAP, las células carecen de complejos respiratorios que posean subunidades codificadas en mtDNA (CI, CIII, CV y CV). Al retirar el CAP, la síntesis de estas proteínas es reiniciada. Para el marcaje específico de estas proteínas, se añade el inhibidor reversible de la síntesis proteica citosólica cicloheximida, y aminoácidos marcados con ³⁵S. Para ello, el medio de cultivo fue sustituido por medio libre de metionina y cisteína (GIBCO) con 100 mg/ml de cicloheximida. Tras una incubación de 5 minutos, se añadió 0.1 mCi de *EasyTagTMEXPRESS ³⁵S Protein Labeling Mix [³⁵S]* (NEG772002MC, Perkin Elmer) que contiene ³⁵S-L-metionina y ³⁵S-L-cisteína. A las 2 horas de marcaje, denominado “pulso” en este tipo de experimentos, el medio de marcaje fue retirado y la placa lavada dos veces con PBS para retirar los restos de aminoácidos radioactivos. El cultivo posterior con medio completo denominado “caza” puede variar en función del análisis que se requiera. En este caso se realizó una caza de 14 horas para observar la inclusión de las proteínas marcadas en los complejos respiratorios reensamblados y evaluar la estabilidad de éstos.

Tras la obtención del pellet celular marcado, éste se mezcló con un pellet de células sin marcar obtenido a partir del cultivo de 10 placas de 150mm. De esta manera se obtiene la cantidad de material necesaria para el aislamiento de mitocondrias sin necesidad de trabajar con un exceso de radioactividad innecesario (sección V.1. *Aislamiento de mitocondrias de cultivos celulares*).

IV.4. Síntesis de proteínas *in vitro*.

Las síntesis de proteínas *in vitro*, fue realizada con dos propósitos. Por un lado, evaluar la reactividad de un anticuerpo con una proteína dada (sección IV.5.4.1) y por otro evaluar el importe de proteínas a mitocondria (sección VI.5). Para ello, las proteínas de interés fueron marcadas durante su síntesis con [³⁵S]–metionina. Para este tipo de marcaje, se utilizó un reactivo de mucha mayor pureza al utilizado para marcaje *in vivo*, que evita el marcaje inespecífico del lisado de reticulocito de conejo utilizado durante la reacción, y

que, habitualmente, complica la visualización, tras electroforesis, de las proteínas sintetizadas (*EasyTagTML-[³⁵S]-Methionine* (NEG709A500UC), Perkin Elmer).

La reacción de síntesis se llevó a cabo con el sistema *TNT® Coupled Reticulocyte Lysate Systems* (Promega). Este sistema utiliza RNA sintetizado *in vitro* por la RNA polimerasa SP6, a partir del vector pTNT, para la síntesis de proteínas en reticulocito de conejo. En primer lugar, los insertos con las secuencias codificantes de las proteínas de interés, fueron incluidos en el vector pTNT (secciones III.3-5). Dicho vector contiene el promotor para la RNA polimerasa SP6 (sección XII. Plásmidos). A continuación, la reacción se llevó a cabo según instrucciones del fabricante, incubando 1 hora y media a 30°C la siguiente mezcla: 25 µl de TNT® lisado reticulocito de conejo, 2 µl de TNT® buffer 25X, 1 µl de TNT® RNA polimerasa SP6, 1 µl de mezcla de aminoácidos sin metionina 1mM, 2 µl (20 µCi) de [³⁵S] metionina (1000Ci/mmol a 10mCi/ml), 1 µl de inhibidor de RNAsas (40U/µl), 2µl de pTNT con cDNA de interés (0,5 ug/ul) y agua libre de RNAsas hasta un volumen total de 50 µl.

La síntesis de cada proteína fue evaluada por SDS-PAGE con 1 µl de la mezcla de reacción.

IV.5. Electroforesis.

IV.5.1. Electroforesis en condiciones nativas Blue native-PAGE.

La resolución de complejos y supercomplejos respiratorios fue llevada a cabo por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas, denominada Blue native-PAGE (BN-PAGE) (Wittig, Braun, et al 2006). Con esta técnica pueden resolverse complejos proteicos tras su solubilización de membranas celulares.

Preparación de muestras.

La solubilización de las membranas mitocondriales fue llevada a cabo con dos detergentes diferentes. Con dodecyl β-D-maltoside (DDM) la mayoría de las interacciones entre complejos respiratorios se rompen, aunque perdura el SC III₂+IV. Con digitonina (DIG), pueden visualizarse tanto lo SCs respiratorios como complejos en forma libre. La relación gramos de detergente:gramos de mitocondria a utilizar, fue puesta a punto previamente para cada especie (Acín-Pérez et al 2008).

Para asegurar la reproducibilidad de la técnica, la solubilización se llevó a cabo de manera sistemática. Sobre alícuotas de 100 µg de mitocondrias purificadas, resuspendidas a una concentración de 10 µg/µl, se añadió digitonina en una relación detergente : proteína mitocondrial 4:1 (g:g) o DDM en una relación 1,6:1 (g:g). La solución de cada detergente fue siempre preparada al 10%, de forma que tampoco la relación de volúmenes cambiara entre una y otra solubilización.

Sobre 100 µg de mitocondria contenidos en 10 µl, se añadieron 4 µl de DIG al 10% (preparado en tampón 50mM NaCl, 50mM imidazol, 5mM ácido aminocaproico, 4mM PMSF) o 1,6 µl de DDM al 10% (preparado en agua milliQ). La mezcla se resuspendió cuidadosamente y se incubó en hielo durante 5 minutos. Después se centrifugó a 13000 g en microfuga durante 30 minutos a 4°C. El pellet obtenido fue desechado y el sobrenadante

mezclado con tampón de carga 4 x (5% Coomassie Blue-G250 en 1M ácido aminocaproico) para su carga en gel.

Preparación de geles de poliacrilamida.

Los geles para resolución de complejos de tan alto y diverso peso molecular, son geles de poliacrilamida en gradiente. El gradiente utilizado es diferente en función de si la muestra es tratada con DDM o DIG, dado que en el segundo caso la existencia de SCs de alto peso molecular requiere de un porcentaje menor de acrilamida en la parte alta del gel. En el caso de la resolución de complejos respiratorios (DDM) se utilizaron geles del 5 al 13% de acrilamida. Para la resolución de SCs y complejos (DIG) los geles eran del 5 al 13%.

Los geles fueron preparados en el laboratorio, con un formador de gradiente, compuesto por dos cámaras, donde se añadieron dos soluciones de diferente porcentaje de acrilamida. En general se utilizó el sistema Mini Protean III (Biorad). Tan solo para los experimentos de espectrometría de masas geles de mayor tamaño (23x16,5 cm) fueron utilizados.

Las mezclas necesarias para hacer los geles son las siguientes:

Tabla 2. Composición geles de poliacrilamida en gradiente para BN-PAGE 3-13%.

Sistema Mini protean III BioRad 1.5mm 3-13%.

Componentes	Solución acrilamida 3%	Solución acrilamida 13%
Acrilamida : bisacrilamida (48:1,5)*	0.305 ml	0.866 ml
Tampón de gel 3x**	1.667 ml	1.111 ml
Agua milliQ	3 ml	0.713 ml
Glicerol 87%	-	0.643 ml
APS 20%	20 µl	12 µl
TEMED	4 µl	3 µl

*Solución acrilamida : bisacrilamida preparada en el laboratorio por disolución en agua milliQ y posterior filtrado

**Gel buffer 3x: Bis-Tris 150 mM. Ácido aminocaproico 1,5 M, pH=7.0

Tabla 3. Composición geles de poliacrilamida en gradiente para BN-PAGE 5-13%.

Sistema Mini protean III BioRad 1.5mm 5-13%.

Componentes	Solución acrilamida 5%	Solución acrilamida 13%
Acrilamida : bisacrilamida (48:1,5)*	0.510 ml	0.866 ml
Tampón de gel 3x**	1.667ml	1.111 ml
Agua milliQ	2.795 ml	0.713 ml
Glicerol 87%	-	0.643 ml
APS 20%	20 µl	12 µl
TEMED	4 µl	3 µl

*Solución acrilamida : bisacrilamida preparada en el laboratorio por disolución en agua milliQ y posterior filtrado

**Gel buffer 3x: Bis-Tris 150 mM. Ácido aminocaproico 1,5 M, pH=7.0

Sobre el gel de gradiente polimerizado se añadió la siguiente solución, para hacer los pocillos donde cargar la muestra:

Tabla 4. Composición geles de poliacrilamida en gradiente para zona superior de BN-PAGE 3-13% o 5-13%.

Componentes	Volúmenes
Acrilamida : bisacrilamida (48:1,5)*	0,25 ml
Tampón de gel 3x**	1 ml
Agua milliQ	1,75 ml
Glicerol 87%	-
APS 20%	12,5 µl
TEMED	3 µl

*Solución acrilamida : bisacrilamida preparada en el laboratorio por disolución en agua milliQ y posterior filtrado.

**Gel buffer 3x: Bis-Tris 150 mM. ácido aminocaproico 1,5 M, pH=7.0

En el caso de geles de mayor tamaño, se prepararon mayores volúmenes conservando las proporciones de los componentes.

Desarrollo de la electroforesis.

La cantidad de muestra cargada en cada pocillo fue la obtenida por solubilización de 100 µg de mitocondrias, excepto en el caso de muestras cuyo fin fuera el análisis por espectrometría de masas, para lo cual se trabajó con muestras de 300 µg.

Para el desarrollo de la electroforesis se utilizaron tampón de cátodo A (tricina 50mM, bis-tris 15mM, pH 7,0, Coomassie Blue G-250 0,02%), tampón de cátodo B (tricina 50mM, bis-tris 15mM, pH 7,0, Coomassie Blue G-250 0,002%) y tampón de ánodo (bis-tris 50mM, pH 7,0). La electroforesis se realizó en cámara fría. La primera media hora se desarrolló a 90 voltios con tampón de cátodo A. Tras ese tiempo, el tampón de cátodo fue cambiado por el tampón de cátodo B. La electroforesis continuó por aproximadamente una hora más a 300 voltios, hasta que el colorante comenzó a salir por la parte baja del gel.

A partir de la electroforesis se pudo revelar la actividad de complejos respiratorios en gel (sección VI.3.1), realizar western blot con anticuerpos contra proteínas de los complejos respiratorios, (sección IV.5.4.1), teñir el gel para después analizar la composición del gel por espectrometría de masas (sección IV. 5.4.2) o recortar carriles del gel para la resolución de las proteínas contenidas en los complejos por segunda dimensión SDS (sección IV.5.2.)

IV.5.2. Electroforesis SDS-PAGE para resolución en segunda dimensión de BN-PAGE (2D BN-PAGE).

Es posible separar las proteínas contenidas en los complejos resueltos por BN-PAGE, con una segunda electroforesis desnaturizante SDS-PAGE. Este tipo de análisis se utilizó para estudiar la estabilidad de los complejos respiratorios tras la síntesis de proteínas marcadas radioactivamente *in vivo* (sección IV.3) o para estudiar la composición proteica de los complejos respiratorios.

Tras recortar la banda del gel de BN-PAGE, éste fue tratado 1 hora a temperatura ambiente con una solución 1% de β-mercaptoetanol y 1% de SDS. De este modo los complejos fueron disgregados en sus proteínas componentes, dentro del gel. Tras secar el

exceso de solución, la banda de gel fue colocada entre los cristales del montaje de electroforesis de tamaño 23x16,5cm, en la parte superior. Una vez cerrado el montaje se realizó el gel con tres soluciones, de abajo a arriba: gel desnaturizante 16,5% de acrilamida (60% del gel), gel desnaturizante 10% acrilamida (25% del gel) y gel nativo 10% acrilamida (15% del gel). Las soluciones se prepararon como se indica a continuación:

Tabla 5. Composición de gel desnaturizante para 2D BN-PAGE.

Componente	Gel separador 16,5% Desnaturizante	Gel concentrador 10%	
		Desnaturizante	Nativo
Acrilamida : bisacrilamida (48:1,5)	8,5 ml	2 ml	2 ml
Tampón gel 3x 2D con SDS*	8,5 ml	3,33ml	-
Tampón gel 3x 2D sin SDS**	-	-	3,33 ml
Agua milliQ	5 ml	3,5 ml	3,5 ml
Glicerol	3ml	1,2 ml	1,2 ml
APS 20%	42 µl	21 µl	21 µl
TEMED	8,5 µl	6,5 µl	6,5 µl

*Tampón gel 3x 2D con SDS: Tris 3M, SDS 0,3%, pH 8,45

** Tampón gel 3x 2D sin SDS: Tris 3M, pH 8,45

Una vez el gel polimerizó incluyendo la banda de BN-PAGE en su parte superior, fueron añadidos las soluciones de cátodo (tricina 0,1M, Tris 0,1M, SDS 0,1%, pH 8,25) y ánodo (Tris 0,2M pH 8,9). La electroforesis se desarrolló durante 1 hora a 10 mA y unas 16 horas a 15- 20mA.

IV.5.3. Electroforesis SDS-PAGE.

La electroforesis para separación de proteínas se realizó en geles de poliacrilamida desnaturizantes. Las muestras de proteínas fueron incubadas por 1 minuto a 95°C con tampón de carga (Tris-HCl 50mM pH 6,8. 2% SDS. 10% glicerol, 1% β-mercaptoetanol, 0,02% bromofenol blue). Posteriormente 30 µg de cada muestra de proteína fueron cargados en un gel del 12,5% de acrilamida y la electroforesis fue desarrollada en solución Tris-glicina a 10 mA por gel durante la migración en el gel concentrador y a 20 mA por gel, una vez la muestra pasó al gel separador.

IV.5.4. Revelado de proteínas.

Las proteínas resueltas en geles BN-PAGE, 2D BN-PAGE o SDS-PAGE, se visualizaron de diferente manera en función del tipo de muestra cargada y del análisis a realizar.

IV.5.4.1. Western blot.

La inmunodetección por western blot fue realizada sobre cualquier tipo de electroforesis previamente descrita.

Resumidamente, las proteínas fueron transferidas a membrana de PVDF (Immobilon-FL, 0,45 μ m) por transferencia en los sistemas Mini Trans-Blot Cell o Trans-Blot Cell de Bio Rad, en solución de transferencia Tris 48mM, glicina 39 mM, 20% metanol, una hora a 100 voltios. Una vez obtenida la membrana, esta fue bloqueada por una hora e incubada con anticuerpo primario toda la noche en agitación a 4°C. Tras tres lavados con PBS-tween 0,1% se incubó con anticuerpo secundario una hora, tras lo cual se realizaron otros tres lavados antes del revelado.

El revelado se ha realizado la mayor parte de las veces por medio de fluorocromos unidos al anticuerpo secundario con el sistema de imagen *Odyssey* (LI-COR biosciences). Esta tecnología permite utilizar dos longitudes de onda diferentes para la toma de imagen, por lo que pueden revelarse al mismo tiempo dos proteínas que comigren en un gel nativo. En otras ocasiones, el revelado se realizó por quimiluminiscencia, con los reactivos *Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent* (Ge Healthcare).

En el caso de que el revelado se realizara por quimioluminiscencia, el bloqueo se realizó con leche al 5% en PBS –tween 0,1% y la dilución de los anticuerpos en leche al 0,2% en PBS –tween 0,1%. En el caso del revelado por fluorescencia, el bloqueo y la dilución de anticuerpos se realizó con *Sea Block blocking buffer* (ThermoFisher) diluido a la mitad en PBS.

Dado que la reproducibilidad de las técnicas de inmunodetección se encuentra limitada por el origen de los anticuerpos, procedemos aquí a especificar los utilizados durante la elaboración de esta tesis (Tabla 6 y Tabla 7). Es posible que, por las constantes fusiones entre casas comerciales, cierta compañía biotecnológica ya no exista como tal pasado el tiempo. En ese caso, la casa comercial que la absorbió, suele comercializar sus anticuerpos indicando el antiguo número de referencia. También es importante destacar, que se ha concretado la aplicación específica, porque no todos los anticuerpos capaces de revelar una proteína en SDS-PAGE son capaces de hacerlo en BN-PAGE, ya que se trata de una electroforesis en condiciones nativas.

Tabla 6. Anticuerpos primarios:

Antígeno en ratón	Especie e isotipo	Clon	Casa comercial	Código	Aplicación
Actina	Conejo IgG	Policlonal	Sigma	A2066	SDS
COI	Ratón IgG2a	Monoclonal	Invitrogen	459600	BN/SDS
COX5B	Conejo IgG	Policlonal	Proteintech	11418-2-AP	BN
EXTL1	Rata IgG2A	Monoclonal	R&D System	MAB4214	SDS
EXTL1	Conejo IgG	Policlonal	Abcam	ab174172	BN/SDS
GAPDH	Ratón IgG1	Monoclonal	Abcam	ab8245	SDS
Epítipo HA	Rata IgG1	Monoclonal	Sigma	11867423001	BN/SDS
NDUFA9	Ratón IgG1	Monoclonal	Abcam	ab14713	BN/SDS
NDUFA8	Conejo IgG	Policlonal	Abcam	ab74126	BN
NDUFB6	Ratón IgG2b	Monoclonal	Invitrogen	A21359	BN
NDUFB7	Conejo IgG	Policlonal	Proteintech	14912-1-AP	SDS
NDUFS1	Conejo IgG	Policlonal	Abcam	Ab169540	BN/SDS
NDUFS2	Conejo IgG	Policlonal	Abcam	ab103024	SDS
NDUFS3	Ratón IgG1	Monoclonal	Abcam	ab110246	SDS
NDUFS4	Ratón IgG1	Monoclonal	Abcam	ab87399	SDS
NDUFS5	Conejo IgG	Policlonal	Proteintech	15224-1-AP	BN/SDS
NDUFV1	Ratón IgG2b	Monoclonal	Sigma	WH0004723M-1	SDS
NDUFV2	Conejo IgG	Monoclonal	Abcam	ab183717	SDS
SDHA	Ratón IgG1	Monoclonal	ThermoFisher	459200	BN
SOD2	Ratón IgG1	Monoclonal	Abcam	ab16956	SDS
TIM23	Ratón IgG2a	Monoclonal	BD Transduction	611222	SDS
TOM20	Conejo IgG	Policlonal	Santa Cruz	sc-11415	BN/SDS
UQCRC1 (CORE1)	Ratón IgG1	Monoclonal	Abcam	ab110252	BN
UQCRC2 (CORE2)	Ratón IgG1	Monoclonal	Abcam	ab14745	BN
UQCRFS1	Ratón IgG2b	Monoclonal	Abcam	ab14746	BN/SDS
VDAC	Ratón IgG2b	Monoclonal	Abcam	ab14734	BN

BN: BN-PAGE; SDS: SDS-PAGE.

En el caso del único experimento realizado en *C.elegans*, el anticuerpo utilizado para revelar CI fue anti NDUFS3 (abcam; ab14711), capaz de interactuar con el homólogo en *C.elegans* NUO-2.

Tabla 7. Anticuerpos secundarios:

Antígeno	Conjugado	Casa comercial	Código	Aplicación
Ratón IgG (H+L)	Peroxidasa	Agilent technologies	P0477	WB- quimioluminiscencia
Conejo IgG (H+L)	Peroxidasa	Agilent technologies	P0478	WB- quimioluminiscencia
Ratón IgG (H+L)	DyLight™ 800	Rockland	610-145-121	WB-fluorescencia
Conejo IgG (H+L)	DyLight™ 800	Rockland	611-145-122	WB-fluorescencia
Ratón IgG (H+L)	Alexa Fluor 680	Life technologies	A21057	WB-fluorescencia
Conejo IgG (H+L)	Alexa Fluor 680	Life technologies	A210766	WB-fluorescencia
Rata IgG (H+L)	IRDye 800	LI-COR	926-32219	WB-fluorescencia

WB: western blot,

IV.5.4.2. Tinción.

Los geles de electroforesis realizados para el análisis por espectrometría de masas, fueron teñidos con solución de tinción (Coomassie Blue R-250 0,25%, metanol 40% y ácido acético 10%) y destañidos con varios lavados en metanol 40% y ácido acético 10%. Tras el tratamiento, los geles fueron rehidratados con agua milliQ.

IV.5.4.3. Revelado de marcaje radioactivo.

El revelado de proteínas marcadas radioactivamente se hizo sobre diferentes soportes. En el caso de 2D BN-PAGE de proteínas sintetizadas *in vivo*, el gel fue secado en secador con bomba de vacío, sobre papel Whatman 3MM. En el caso de proteínas sintetizadas *in vitro* se realizó transferencia a membrana de PVDF.

Ambos soportes fueron expuestos en *cassette* de revelado, sobre una película fotográfica con pantalla intensificadora, a -80°C por tiempos variables en función de la señal obtenida en un primer revelado. En el caso de la membrana de PVDF, ésta pudo ser reutilizada, una vez la radioactividad hubo decaído, para la inmunodetección por western blot.

V. AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS.

V.1. Aislamiento de mitocondrias de cultivos celulares.

El aislamiento de mitocondrias a partir de cultivos celulares, se realizó a partir de 10-15 placas de 150 mm, según el método de centrifugación diferencial descrito previamente (Fernández-Vizarra et al 2010).

Resumidamente, las células fueron lisadas por shock hipotónico con 7 volúmenes de medio hipotónico (sacarosa 83mM, MOPS 10mM, pH 7,2) y homogeneización en homogeneizador de tejidos tipo *potter*. A continuación, 7 volúmenes de medio hipertónico (sacarosa 250mM, MOPS 30m, pH 7,2) fueron añadidos. La mezcla fue centrifugada a 1000g, 5 minutos y el sobrenadante obtenido a 12000 g, 12 minutos. El pellet obtenido fue resuspendido en medio A (sacarosa 0,32M, EDTA 1mM, Tris-HCl 10mM, pH 7,4) Tras varias centrifugaciones a 15000g, 2 minutos, hasta obtener un sobrenadante transparente, el

pellet fue resuspendido en medio MAITE (sacarosa 25mM, sorbitol 75 mM, KCl 100mM, EDTA 0,05mM, MgCl₂ 5mM, Tris-HCl 10mM, ácido ortofosfórico 10mM, pH 7,4). Tras centrifugación a 15000 g, 5 minutos, el *pellet* obtenido fue cuantificado y resuspendido en Bis-Tris 50mM, 1M ácido animocaproico a una concentración de 10 µg / µl. Las muestras de mitocondrias fueron conservadas a -80°C en alícuotas de 100 µg. Todo el proceso fue realizado manteniendo las muestras en hielo y las centrífugas a 4°C.

V.2. Aislamiento de mitocondrias de tejidos.

El aislamiento de mitocondrias a partir de tejidos se realizó según el método descrito previamente (Fernández-Vizarra et al 2010).

El método es similar al utilizado para el aislamiento a partir de células, exceptuando el uso de medio hipotónico e hipertónico al comienzo del protocolo. Los tejidos fueron troceados con ayuda de tijera y bisturí. Una vez disgregados se añadieron diferentes medios, según tejido, para la homogeneización en el homogeneizador tipo *potter*. En el caso de hígado se añadieron 4 ml por mg de tejido, de medio A (sacarosa 0,32M, EDTA 1mM, Tris-HCl 10mM, pH 7,4) y en el caso de corazón y cerebro, 10 ml por gramo de tejido, de medio AT (sacarosa 0,075 M, sorbitol 0,225M, EGTA 1mM, BSA libre de ácidos grasos 0,1%, Tris-HCl 10mM, pH 7,4). El resto del proceso fue similar al aislamiento a partir de células (sección V.1).

V.3. Aislamiento de mitocondrias y tratamiento con proteinasa K.

La localización mitocondrial de proteínas se evaluó aislando mitocondrias de la manera habitual (secciones V.1 y V.2) y añadiendo proteinasa K a una concentración final de 40 µg/ml, 15 minutos.

Para el análisis por SDS-PAGE se tomó muestra de homogenado (Hom: muestra de tejido o células tras homogeneización y primera centrifugación a 1000g, 5 minutos), muestra de “citósol” (Cit: sobrenadante tras segunda centrifugación a 12000g 12 minutos), muestra de mitocondria (Mit: *pellet* tras última centrifugación con medio MAITE) y mitocondria tratada con proteinasa K (Mit+PK).

V.4. Aislamiento de mitocondrias para medida de CoQH₂/CoQ.

El aislamiento de mitocondrias a partir de cultivo celular, para la medida de la ratio CoQH₂/CoQ, se realizó como se resume a continuación.

El *pellet* celular fue resuspendido en 5 volúmenes de solución de aislamiento (HEPES 2mM, KCl 10mM, MgCl₂, EGTA 0,5mM, 1mM PMSF, β-mercaptoetanol 0,5mM, pH 7,4). Tras lisar las células con homogeneizador, se añadió un volumen similar de solución de aislamiento con sacarosa 640 mM, para generar ambiente isosmótico (sacarosa 320 mM). Se centrifugó a 1000 g, 10 minutos y el sobrenadante obtenido a 12000 g, 15 minutos. El *pellet* fue congelado con nitrógeno líquido, en condiciones de anaerobiosis.

VI. MEDIDAS DE FUNCIÓN MITOCONDRIAL.

VI.1. Medidas de consumo de oxígeno.

V.1.1. Medida con electrodo tipo Clark en células permeabilizadas.

La medida de consumo de oxígeno en células digitonizadas permite el uso de sustratos específicos de cada complejo respiratorio, lo que permite también el análisis del cálculo de actividad de cada complejo (Götz Hofhaus et al 1996).

Cinco millones de células resuspendidas en 1 ml de medio de respiración (HEPES 20mM pH 7.1, sacarosa 250 mM, $MgCl_2$ 10mM, ADP 1mM y fosfato potásico 2mM) fueron introducidas en la cámara termostatzada a 37°C de un electrodo tipo Clark con agitación (Oxytherm, Hansatech Instruments). Las células fueron permeabilizadas con baja concentración de digitonina (5 μ l de digitonina al 1%, o lo que es lo mismo, 10 μ g de digitonina por millón de células) e incubadas 10 minutos con la cámara abierta para permitir el consumo de los sustratos endógenos.

A continuación, la cámara fue cerrada y los sustratos e inhibidores de complejos respiratorios añadidos por medio de jeringas Hamilton. El registro del consumo de O_2 en la cámara, permitió evaluar actividad de cada complejo en función de la respiración producida tras adición de su sustrato específico. Para ello se añadieron de forma secuencial sustrato de CI (10 μ l de glutamato 0,5 M y malato 0,5 M), inhibidor de CI (10 μ l de rotenona 100 μ M), sustrato de CII (10 μ l de succinato 0,5 M), inhibidor de CIII (10 μ l de antimicina A 10 μ M), sustrato de CIV (10 μ l de TMPD 120 mM) e inhibidor de CIV (20 μ l de KCN 400 mM). La pendiente obtenida en la línea de registro de O_2 es indicativa de la actividad del complejo para el que se añadió sustrato. En cada caso, ha de restarse la pendiente resultante tras la adición del inhibidor del complejo en presencia de ese mismo sustrato.

V.1.2. Medida en analizador Seahorse XF96 en células intactas.

El consumo de oxígeno fue medido con un analizador *X96 Extracellular Flux Analyzer* (Sea Horse Bioscience) de dos inyectores. Este analizador permite medir el consumo de oxígeno u OCR (*oxygen consumption rate*, medido en pmoles /minuto) por medio de sensores de oxígeno colocados sobre cada uno de los 96 pocillos de una placa de cultivo, y analizar diferentes parámetros en función de los compuestos inyectados sobre las células de manera secuencial. Para ello el experimento es llevado a cabo en una placa de cultivo de 96 pocillos, sobre la cual, durante la medida, es colocado un cartucho que incluye los sensores de oxígeno y los reservorios para los compuestos a inyectar.

En nuestro caso se evaluó en primer lugar la respiración basal. Tras la inyección de oligomicina (inhibidor de ATPasa), se obtuvo el valor de la respiración remanente no acoplada a producción de ATP. A continuación, la inyección de un desacoplante, reveló el valor de respiración máxima en cada tipo celular.

El protocolo fue llevado a cabo según instrucciones del fabricante. Resumidamente, el día anterior al experimento 20.000 células por pocillo fueron sembradas en placa de 96. El cartucho con los sensores de oxígeno fue incubado, para su hidratación con líquido de calibrado, en un incubador sin CO_2 a 37°C. El día del experimento se preparó el medio para ensayo suplementando el medio *Seahorse XF Base* con piruvato 1 mM, glutamina 2mM,

glucosa 10mM y ajustando pH a 7,4 (medio sin SFB ni bicarbonato). Las células fueron incubadas en ese medio durante una hora en el incubador sin CO₂. El cartucho ya hidratado fue cargado con la oligomicina y el FCCP, diluïdos en medio *Seahorse XF Base* a las concentraciones necesarias para que la concentración final tras su inyección en el medio de cultivo celular fuera 1 µM y 0,4 µM respectivamente. Una vez acabada la incubación de las células en atmósfera sin CO₂, el cartucho fue colocado sobre la placa de células, de manera que los sensores entraron en contacto con el medio de cultivo celular. La placa fue cargada en el analizador que, tras las calibraciones necesarias, comenzó la medida de consumo de oxígeno, que tuvo lugar a lo largo de una hora y media en condiciones basales, con oligomicina y con FCCP. Los datos obtenidos fueron analizados con el programa *Agilent Seahorse XF Analyzer*. Los datos fueron normalizados por el contenido en DNA, medido con el ensayo de fluorescencia CyQUANT™ (ThermoFisher).

VI.2. Determinación de CoQH₂/CoQ.

La determinación de la ratio CoQH₂/CoQ fue llevada a cabo en el laboratorio del Dr. Plácido Navas, en el Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (Sevilla). El método seguido es como el descrito previamente (Lagendijk et al 1996) con modificaciones (Brea-Calvo et al 2006). Resumidamente, las especies CoQ₉H₂/CoQ₉ y CoQ₁₀H₂/CoQ₁₀, fueron detectadas mediante HPLC tras la extracción con n-propanol en tampón Tris -HCl 50 mM pH 7,4. Para cada medida fueron necesarios 0,6 mg de proteína mitocondrial tratada con β-mercaptoetanol 0,5mM y suplementada con un *estándar* interno de CoQ₆.

VI.3. Medida de actividad de complejos respiratorios.

VI.3.1 Medida de actividad en gel.

La medida de actividad NADH deshidrogenasa del complejo I fue determinada en el mismo gel tras electroforesis BN-PAGE (sección IV.5.1). El gel fue incubado en una solución de revelado (Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4, NADH 0,14mM y NitroBlue tetrazolium 1 mg/ml) a temperatura ambiente. La visualización se realizó gracias al precipitado de color morado producido tras la reducción del NitroBlue tetrazolium por acción de la actividad NADH deshidrogenasa de CI.

VI.2. Medida de actividad enzimática por espectrofotometría.

La actividad enzimática se calculó por análisis cinético de la variación en la absorbancia (ΔA/min) durante la conversión de un sustrato en la reacción llevada a cabo (Birch-Machin and Turnbull 2001).

Una vez obtenido ese valor por espectrofotometría, y conociendo el coeficiente de extinción molar (ε) del reactivo con el que se revela la reacción, la actividad enzimática (UI) se calculó con la siguiente reacción:

$$UI/I = \Delta A/min * 1000(\mu M/mM) * dilución / \epsilon (mM^{-1}cm^{-1}) * L (1cm)$$

UI: µmoles de sustrato transformados por minuto.

ΔA/min: incremento de la absorbancia por minuto.

ε: coeficiente de extinción molar (ε) del reactivo con cuya absorbancia se revela la reacción.

L: longitud del paso de luz, anchura de la cubeta (1cm).

En todos los casos se partió de mitocondrias resuspendidas a 10 μg / μl en medio B (sacarosa 250mM, HEPES 2mM, EGTA 0,1mM) y la reacción tuvo lugar en medio C1/C2 (K_2HPO_4 25mM, MgCl_2 5mM, KCN 3mM y BSA 2,5 mg/ml) a 30 °C.

VI.2.1. Actividad NADH deshidrogenasa sensible a rotenona (complejo I).

La actividad de CI se determinó por la disminución de absorbancia a 340nm, debida a la oxidación de NADH, cuyo ϵ es 6,22 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Todas las reacciones se realizaron en paralelo con y sin rotenona, siendo el $\Delta\text{A}/\text{min}$ en este caso la diferencia entre el $(\Delta\text{A}/\text{min})_{\text{sin rotenona}}$ y $(\Delta\text{A}/\text{min})_{\text{con rotenona}}$, de modo que la oxidación de NADH debida a otras enzimas NADH deshidrogenasas fue excluida.

10 μl de mitocondrias fueron resuspendidos en 950 μl de medio C1/C2, con 2 μl de antimicina 1mg/ml y 13 μl de CoQ_1 10mM (Sigma C7956) y 6 μl de rotenona 500 μM en el caso del duplicado con rotenona. Sobre la mezcla se añadieron 10 μl de NADH 13mM. Tras 2 minutos, se midió absorbancia a 340 nm otros 4 minutos.

VI.2.2. Actividad succinato deshidrogenasa (complejo II).

La actividad de CII se determinó por el incremento de absorbancia a 600nm, debida a la reducción del diclorofenol-indofenol (DCPIP) cuyo ϵ es 19,2 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

3 μl de mitocondrias fueron resuspendidos en 950 μl de medio C1/C2, con 10 μl de succinato 1M. La mezcla fue incubada a temperatura ambiente durante 10 minutos, tras lo cuales se añadieron 6 μl de DCPIP 5mM, 2 μl de antimicina 1 mg/ml y 10 μl de rotenona 500 μM . Tras incubar 2 minutos, se añadieron 2 μl de CoQ_1 65 mM y se registró la absorbancia durante 4 minutos.

VI.2.3. Actividad citrato sintasa.

La actividad de citrato sintasa se determinó por el incremento de absorbancia a 412nm, debido a la reducción del ácido 5,5-Ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB) cuyo ϵ es 13,6 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

4 μl de mitocondrias fueron resuspendidos en 950 μl de medio C1/C2, con 3,3 μl de acetyl CoA 7 mg/ml, 10 μl de Triton X-100 10% y 100 μl de DNTB 1mM fresco resuspendido en Tris-HCl 1M pH 8. Sobre esta mezcla se añadieron 5 μl de oxalacetato 50 mM y se midió el incremento de absorbancia durante 1 minuto.

VI.4. Determinación de peróxido de hidrógeno.

La determinación de peróxido de hidrógeno se realizó por medio de tinción con diacetato de dihidroclorofluoresceína (DCFH-DA), la cual una vez oxidada por peróxidos es oxidada a diclorofluoresceína fluorescente, que emite señal a 525 nm al ser excitado por láser de 488 nm.

Un millón de células por condición fueron recogidas en 500 µl de PBS al que se añadió DCFH a una concentración final de 0,4 µM. Tras 30 minutos de incubación en oscuridad, las células fueron lavadas con PBS y resuspendidas de nuevo en PBS con yoduro de propidio 0,001%. Las células fueron analizadas por citómetro de flujo *FACS-Canto* en función de su fluorescencia (emisión debida a excitación por láser 488nm) y los datos fueron procesados con el programa *FACS Diva de BD Biosciences*.

VI.5. Importe a mitocondria de proteínas sintetizadas in vitro.

El importe a mitocondria de proteínas, sintetizadas y marcadas radioactivamente *in vitro*, fue evaluado con este tipo de ensayo.

Se tomaron 5 µl de la mezcla de reacción de síntesis de cada proteína de interés (sección IV.4) que fueron incubados con 40 µl de medio de reacción (succinato 2mM, ATP 1mM, BSA 1mg/ml, metionina 1mg/ml y cloranfenicol 40 µg/ ml, en medio MAITE: sacarosa 25mM, sorbitol 75 mM, KCl 100mM, EDTA 0,05mM, MgCl₂ 5mM, Tris-HCl 10mM, ácido ortofosfórico 10mM, pH 7,4) y 100 µg de mitocondrias frescas de hígado de ratón, purificadas del modo habitual (sección V.2).

Tras 1 hora a 37°C, se realizaron dos lavados con medio de reacción para eliminar el resto de proteína radioactiva. Las mitocondrias, resuspendidas en medio de reacción, fueron incubadas otra hora a temperatura ambiente, girando en noria, tras lo cual fueron lavadas de nuevo y el *pellet* recogido para análisis.

VII. MICROSCOPIA.

Las células fueron incubadas durante 20 minutos con una concentración 100nM de la sonda *MitoTracker Red* (Molecular Probes). Tras la tinción mitocondrial, las células fueron fijadas con paraformaldehído 4% y permeabilizadas con metanol frío. Tras bloqueo con 2% de BSA, las células fueron incubadas con anticuerpo primario anti HA (Sigma) y anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 (Molecular Probes). La imagen fue tomada por microscopía confocal en microscopio *Leica SPE*.

VIII. INMUNOCAPTURA.

La inmunocaptura de CI a partir de mitocondria solubilizadas con DDM o DIG, fue llevada a cabo con el *kit* de inmunocaptura de complejo I de abcam (ab109711), según instrucciones del fabricante. La cantidad de material de partida fue diferente si el propósito era realizar SDS para western blot o para análisis por espectrometría de masas, dado que para la segunda es necesaria mayor cantidad de proteína inmunocapturada. La relación

estimada es que, a partir de 2,5 mg de proteína mitocondrial incubados con 250 µg de anticuerpo, se pueden obtener 60 µg de CI. Para cada condición que iba a ser analizada por western blot se utilizaron 1,2 mg de mitocondrias solubilizadas en 125 µg de anticuerpo y para cada condición analizada por espectrometría de masas, 5 mg de mitocondrias solubilizadas en 500 µg de anticuerpo.

La inmunocaptura de epítipo HA, para la captura de la proteína EXTL1 HA, fue llevada a cabo con anticuerpo anti HA (Sigma, código 11867423001) unido covalentemente a bolitas magnéticas con el *kit Pierce™ direct Magnetic IP/Co-IP* (ThermoFisher), según instrucciones del fabricante.

IX. REAL TIME PCR.

Dos tipos de Real time-PCR (RT-PCR) fueron realizados con diferentes propósitos.

IX.1. Ensayo de cuantificación absoluta.

La titulación de partículas lentivirales producidas por transfección en células 293T (sección I.5), fue realizada por RT-PCR por análisis de cuantificación absoluta (Scherr et al 2001). Para ello fueron diseñados dos cebadores y una sonda TaqMan, capaces de amplificar una región específica del plásmido de transferencia, la región LTR (*long terminal repeat*) que flanquea el trasgén.

La RT-PCR fue realizada tanto en una dilución serial del plásmido de transferencia, para la obtención de una recta patrón, como en las muestras a titular. La reacción se llevó a cabo en un volumen de 20 µl (10 µl TaqMan Master Mix 2x de Applied Biosystem, 1 µl de cada cebador y sonda 10 µM, 1 µl de dilución de plásmido o muestra a titular y 5 µl de agua) en el sistema 7900 *FAST-PCR* (Applied Biosystem). Los resultados fueron analizados con el programa de análisis *SDS v2.3* (Applied Biosystem).

Las secuencias de cebadores y sonda son las siguientes:

Cebador Fw: 5' GCTTGCCTTGAGTGCTTCA 3'

Cebador Rv: 5' TGAATAAAAGGGTCTGAGGG 3'

Sonda TaqMan: 5'FAW-TGCCCGTCTGTTGTGTGTGACTC 3'

Las condiciones de reacción fueron 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C y 40 ciclos de dos pasos (15 segundos a 95°C y 60 segundos a 60°C).

Una vez obtenida el valor de *Ct* (*threshold cycle*) para cada muestra, se hizo una representación semilogarítmica para la obtención de la recta patrón. Se representó el logaritmo del número de copias de plásmido en cada dilución (estimado en función de los nanogramos cargados y los nanogramos que se calcula pesa el plásmido con un número determinado de pb) frente a la *Ct* obtenida para cada dilución. Sobre la recta patrón se interpoló el valor de *Ct* obtenido para cada muestra a titular, obteniéndose así el número de copias de plásmido presentes en dicha muestra y por tanto el número de partículas lentivirales.

IX.2. Ensayo de cuantificación relativa.

Para análisis de expresión relativa de genes de interés se extrajo RNA de cultivo celular con Trizol (Invitrogen) seguido de purificación por *RNeasy Mini Kit* (Qiagen). A partir de 1 µg de RNA se sintetizó cDNA con *PrimerScript RT Reagent Kit* (Takara) en un volumen final de 20 µl, según instrucciones del fabricante.

La reacción de amplificación por RT-PCR se realizó con *SYBR Green master mix 2x* (Applied Biosystem) en un volumen de 10 µl (5 µl de mix, 0,4 µl de cada cebador 10 µM, 0,5 µl de cDNA y 3,7 µl de agua) en el sistema *7900 FAST-PCR* (Applied Biosystem). Las condiciones de reacción fueron 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de tres pasos (15 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C y 30 segundos a 72°C) y una curva de disociación con 15 segundos a 95°C, 15 segundos a 60°C y otros 15 segundos a 95°C. Los resultados fueron analizados con el programa de análisis *SDS v2.3* (Applied Biosystem). Una vez obtenidos los valores de Ct (*threshold cycle*) para cada condición, la expresión relativa de cada gen en dos condiciones diferentes, se calculó por el sistema de comparación de Ct.

Los cebadores utilizados fueron los siguientes:

Prolil hidroxilasa (PHD3):

5'- TGGACAACCCCAATGGTGAT- 3'

5'- GCAGGACCCCTCCATGTAAC - 3'

Piruvato deshidrogenasa kinasa (PDK1):

5' AGCAGTTCCTGGACTTCG- 3'

5'-CTCCTGAAGGCTTTGGATATACC

Hipoxantina fosforibosil tranferasa (HPRT) (gen normalizador):

5' TCCTCCTCAGACCGCTTTT 3'

5' CCTGGTTCATCATCGCTAATC 3'

Actina (gen normalizador):

5' TCTCTTTGATGTCACGCACGAT 3'

5' TGACCGAGCGTGGCTACA 3'

X. TÉCNICAS PROTEÓMICAS.

Las técnicas proteómicas aquí indicadas fueron realizadas en el grupo de proteómica del Dr. Jesús Vázquez del CNIC, a partir de las muestras obtenidas en experimentos realizados en el contexto de esta tesis doctoral. A continuación, se muestra una visión global de los protocolos para el entendimiento general del procesamiento de las muestras y el fundamento de las técnicas.

X.1. *Data Independent Scanning* (DIS).

El método de adquisición de datos utilizado durante la espectrometría de masas realizada en nuestros experimentos, es el denominado *Data Independent Scanning* (DIS). Este método, puesto a punto en el laboratorio de proteómica del CNIC, es un método de adquisición de datos independiente de la intensidad iónica (Guarás et al 2016). Se trata de una metodología

más sensible y reproducible que otras utilizadas hasta la fecha para el estudio del complexoma mitocondrial en BN-PAGE (Heide et al 2012, Helbig et al 2009, Wessels et al 2009). Este método de adquisición de datos es independiente de la intensidad de cada una de las especies presentes en la muestra, por lo que todas ellas son fragmentadas y analizadas, en contraposición con el habitual modo de adquisición de datos denominado *Data dependent* en que sólo las especies dentro de mayor abundancia son fragmentadas. Con *DIS* por tanto, el análisis es más profundo, se mejora el rango dinámico del análisis y el rendimiento de la identificación.

X.2. Análisis cuantitativo de proteínas mitocondriales.

Las muestras de proteína mitocondrial generadas en el experimento de hipoxia-reoxigenación fueron sometidas a marcaje isotópico $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ (López-Ferrer et al 2006). Resumidamente, la muestra control (hipoxia) fue digerida con tripsina en presencia de H_2^{18}O (500mM citrato de sodio pH 6, 20% acetonitrilo, 1 μg de tripsina : 200 μg proteína), de forma que al extremo C-terminal de cada péptido generado por digestión, fueron incorporados dos átomos de ^{18}O , variando de esa manera su masa molecular. Cada muestra de cada punto de reoxigenación fue digerida en presencia de H_2^{16}O (agua común) y después mezclada a partes iguales con muestra control (hipoxia). Las mezclas de péptidos fueron analizadas por cromatografía líquida acoplada a espectrómetro de masas (LC-MS/MS) y sus espectros de fragmentación obtenidos por *DIS*. La cuantificación relativa de cada péptido, a partir del espectro obtenido, fue llevada a cabo por medio del análisis estadístico generado en el mismo laboratorio (Ramos-Fernandez et al 2007).

X.3. Análisis del estado de oxidación de cisteínas.

El estado de oxidación de las cisteínas mitocondriales fue analizado por medio de la técnica de marcaje diferencial de cisteínas GELSILOX, puesta a punto en el laboratorio de proteómica del CNIC (Martinez-Acedo et al 2012). Resumidamente, la muestra de proteína mitocondrial, fue tratada con tampón de carga para SDS-PAGE (450 mM Tris-HCl, pH 8.45, 12% glicerol, 4% SDS y 0.05% bromofenol blue) al que se añadió 50 mM de iodoacetamida para alquilar los residuos de cisteína presentes en forma reducida en la muestra. Tras la alquilación, la muestra fue concentrada por electroforesis en la zona concentradora (*stacking*) de un gel SDS-PAGE y la banda fue escindida del gel. Antes de proceder a la habitual digestión con tripsina, se realizó la reducción en gel con 10mM de ditioneitol, una hora a 56°C. De este modo, las cisteínas que se encontraban oxidadas en la muestra en un inicio, fueron reducidas y posteriormente sometidas a alquilación con 50mM de metilmetanotiosulfonato, una hora en oscuridad.

Los péptidos, con alquilación diferencial de cisteínas, fueron analizados por LC-MS/MS y los datos adquiridos mediante *DIS*. La determinación semicuantitativa de los péptidos que contenían cisteínas en uno y otro estado de oxidación, fue realizada en función del espectro de fragmentación obtenido para cada uno de ellos, a partir del cual se obtuvo el parámetro *SpScore*, por medio del motor de búsqueda *Sequest*. Este parámetro, se encuentra relacionado con la bondad de fragmentación del péptido y es proporcional a la abundancia de péptido dentro de un rango como el estudiado (Guarás et al 2016).

X.4. Análisis de correlación.

El análisis de correlación entre el perfil de migración de cada proteína detectada en el análisis de BN-PAGE y el perfil de migración de CI, fue realizado en función de las PSMs (*peptide spectrum match*) obtenidas para cada péptido. El valor de PSM es un parámetro cuantitativo y correlaciona con el número de veces que fue identificado un péptido.

En primer lugar, se generó una matriz de datos normalizados del perfil de CI. Para ello todas las PSMs de todas las proteínas de CI fueron sumadas en cada una de las 26 bandas recortadas del gel (Σ PSMs). El dato de Σ PSMs de cada banda fue normalizado respecto de una banda de referencia a la que se asignó valor 1, aquella que contenía mayor cantidad de CI y que correspondía con la zona de migración de CI libre (banda 8). De este modo se obtuvo una secuencia de 26 valores que representaba la cantidad relativa de CI a lo largo del gel. Por otro lado, se calculó para cada proteína detectada la suma de PSMs en cada una de las 26 bandas. Un análisis de correlación entre la secuencia de valores de CI y la de cada una de las proteínas, arrojó un valor de coeficiente de Pearson, indicativo del grado de correlación entre el perfil de migración de CI y de cada una de las proteínas detectadas en el gel.

XI. SECUENCIAS CODIFICANTES.

En marrón se indican los nucleótidos de la secuencia codificante para epítipo HA.

En rojo se indican los nucleótidos que han sido cambiados respecto a la secuencia original (para evitar corte por enzimas de digestión o unión de shRNAs en experimentos de interferencia).

AOH-HA (*Emericella nidulans*) adaptado a codón *bias* de ratón

ATGAACAGCATGAGCACCACCGGCCAATCAGGGTGGCCGCCATCCCAAAGCACTACCTGCAGTTCACCG
TGAGGACCTACACCAGGAGCATGGCCAGCGCCGCCCTGAGGTACAGCAACCCACCCTGGTGAAGAAGTG
TTACGACCAGCCAACCGGCAAGAGGTTTCATCAGCAGCACCCACAGAGCCAGATCAAGGACTACTTCCCA
CCACCAGACGCCCCAAAGATCGTGGAGGTGAAGACCGCCTGGGCCCACCCAGTGTACAGCGAGGAGGAGA
TGAGGGCCGTGACCGTGGGCCACAGGGAGGCCAAGAACTGGAGCGACTGGGTGGCCCTGGGCAGCGTGAG
GCTGCTGAGGTGGGGCATGGACCTGGTGACCGGCTACAAGCACCCAGCCCCAGGCCAGGAGGACATCAAG
AAGTTCCAGATGACCGAGAAGGAGTGGCTGAGGAGGTTCTGTTCCTGGAGAGCGTGGCCGGCGTGCCAG
GCATGGTGGGCGGCATGCTGAGGCACCTGAGGAGCCTGAGGAGGATGAAGAGGGACAACGGCTGGATCGA
GACCTTGCTGGAGGAGGCCTACAACGAGAGGATGCACCTGCTGACCTTCCCTGAAGATGGCCGAGCCAGGC
TGGTTTCATGAGGCTGATGGTGCTGGGCGCCAGGGCGTGTTCCTTCAACGGCTTCTTCCTGAGCTACCTGA
TCAGCCCAAGGACCTGTACAGGTTCTGTGGGCTACCTGGAGGAGGAGGCCGTGCTGACCTACACCAGGGC
CATCAAGGACCTGGAGAGCGGCAGGCTGCCACACTGGGAGAAGCTGGAGGCCCCAGAGATCGCCGTGAAG
TACTGGAAGATGCCAGAGGGCAACAGGACCATGAAGGACCTGCTGCTGTACGTGAGGGCCGACGAGGCCA
AGCACAGGGAGGTGAACCACACCCCTGGGCAACCTGAAGCAGGCCGTGGACGTGAACCCATTGCGCGTGGA
GTGGAAGGACCAAGCAAGCCACACCCAGGCAAGGGCATCAAGCACCTGAAGACCACCGGCTGGGAGAGG
GAGGAGGTGGTG**TACCCCTATGATGTGCCAGATTACGCC**TGATAA

SOD2

ATGTTGTGTCGGGCGGCGTGCAGCACGGGCAGGAGGCTGGGCCCTGTGGCCGGTGCCGCGGGCTCCCGGC
 ACAAGCACAGCCTCCCAGACCTGCCTTACGACTATGGCGCGCTGGAGCCACACATTAACGCGCAGATCAT
 GCAGCTGCACCACAGCAAGCACCACGCGGCCTACGTGAACAATCTCAACGCCACCGAGGAGAAGTACCAC
 GAGGCTCTGGCCAAGGGAGATGTTACAACCTCAGGTCGCTCTTCAGCCTGCACCTGAAGTTCAATGGTGGGG
 GACATATTAATCACACCATTTTCTGGACAAACCTGAGCCCTAAGGGTGGTGGAGAACCCAAAGGAGAGTT
 GCTGGAGGCTATCAAGCGTGACTTTGGGTCTTTTGAGAAGTTTAAGGAGAAGCTGACAGCCGTGTCTGTG
 GGAGTCCAAGGTTCAAGGCTGGGGCTGGCTTGGCTTCAATAAGGAGCAAGGTCGCTTACAGATTGCTGCCT
 GCTCTAATCAGGACCCATTGCAAGGAACAACAGGCCCTTATTCGCTGCTGGGGATTGACGTGTGGGAGCA
 CGCTTACTACCTTCAGTATAAAAAACGTCAGACCTGACTATCTGAAAGCTATTTGGAATGTAATCAACTGG
 GAGAATGTTACTGAAAGATACACAGCTTGCAAGAAAGTGA

EXTL1 (a partir de mRNA NM_019578.2)

ATGCTGTGGAGAAGAAAGTCCTTCTGGCTGGCGTTGTCAGCCTTCTGGCTCCTCCTCGTCTCCTAGGAG
 TCTTCCCCCTTCGCCTGGCAGTGTTGCCCGGTCCCTCTCCAGGGCGCTCCCAAGGCTGGCCCCGCTGGCT
 GGATGCTGCCTTCTTACAGAGTTTCTCCAGTCTGAGACGAACCCAGAAGATGTCGCACAGCTCCCTCGG
 GTCTCTCGGGGAAGCAGCTGCACCTGGGGAGCCTGCTTTGACACCTCCAAGTGTAGGGGAAAGGTCTCTCA
 AGATCTTTGTGCACTCCCCGGCTGGTCCGACCTCTGAGGCTCAGCGCAGATCCTGGATTCCCTTGGGAAGG
 CTCCCCGCTACTCTGCACTCAGCCCAGCAGACGCTTGCCCTTCTCCTTTTTCTCCCCAGCCAGGATCGTAGA
 GGAGCCTGCGGGCCCCCTGCCTCCGAACCTGGAACGGAGGCGGAACCATCTGGTGTGAGTCTCTACCCAG
 CCCCTTGACACCAGGCTGGGACAGGCGATGGTAGCTGAGGCCAGCCCCCTCCTCGGACATCTTCCGACCGGG
 CTTGATTTAGCGCTCCCGTATCTCCCCGAAGCTCACCATTGCGAGGTGGGGCTCCCGGAAGCTGCAG
 CAGCACAGTCCCCAACCTGGGGCCACCTTACTGGCGGTAGCAGAGGAGAAAGGCAGGTGGCGTATCACAA
 GCACCCACGCCTCAGCCTGCCTCTGGGACAGGCACTGTGAGCAAGACCCTGGACCCCAGCAGACCTACCC
 AGGAGAGACCCTTCCCAATGCCACCTTCTGCTCATCCCTGGTCAACGATCTGCCACCTCCTGCTTTCTC
 CAAGCCCTTCAGGCCGGCTGCATCCCCGTGCTCCTCAGCCCCCGCTGGGAGCTGCCTTTCTCTGAAGTCA
 TCGACTGGACCAAGGCAGCCATCATTTGCTGATGAGAGACTCCCACTGCAGGTCTGGCTGCCCTCCGTGA
 AATGCTCCCTTCGAGGGTCTTCGCCCTGCGCCAGCAGACCCAGTTTCTGTGGACCGCTTACTTCTCCTCG
 GTGGAAGAAAGTTATCCATACCACCTTAGAGATTATTCAGGACCGGATCTGGGGTGCATCAGGTACCCCT
 CACTGATGTGGAATAGCCCCCGGGAGCACTCTTGCGCTGCCACATTTTCCACGAGCCTTCAAGACTT
 CCCCTTTTATCATCTGCAACTGGGCTCTGGCCCTGGGAGCAGTTTCAGCGCCGTGATCTGGGTGGGAGCC
 TCTGGAGAGTCCCTGCTGAAGCTCATCCAGGAGGTGGCAGGTTCTCGGCACCTGTGCCAGATCCTGATTC
 TCTGGAACAGTGAGAAGCTGCCCCCTGACAGGTGGCCGAGACAGCAGTGCCCCCTAACAGTCATCAAGGG
 GCACAGGAAGGTCAGCAACCGGTTCTTCCCGTACAGCAACATCAGCACCAATGTTATCCTCAGCCTTGAT
 GCTCAGAGCACTCTTCTTACCAGTGAGGTGGACTTTGCCCTTTGTGGTGTGGCAGAGCTTTCCTGAGCGGA
 TGGTGGGCTTTCTGTCTGGAAGCCACTTCTGGGATGAGGCCAGGGTGGCTGGGGCTACCGTACTGGGAT
 GACCAATGAGTTCTCCATGGTCTGACCACGGCTGCCCTTCTACCACAGGTACTACCACACCCCTCTTACC
 CACTCCCTGCCTAAGGCCCTGAGGACCATAGCTGATGAGACTCCCACCTGTGTTGACGTCTCTGATGAAC
 TCCTGGTAGCCACCGTCACCAAACTGCCCCCTATCAAGGTGCCCTTATGGGAGGCAGCACCCGGAGGCTGT
 GCCAATGGATTCTGGGGA^{CC}CACGACCAGTGCCGGAGCCTCAGCCCCCTGGATCAAGATTGTATTAATCGC
 TTGGCAGCAGGGTTCGGCCACATGCCTCTGGTTTCTCTCAAGTGCGTCTGGA^{CC}CGGTGTTGTTCAAGG
 ACCCGGTATCGGTGCAACGTAAAAAATACCGTAGCCTGGAGAAGCCATAGTAA

EXTL1-HA

ATGCTGTGGAGAAGAAAGTCCTTCTGGCTGGCGTTGTCAGCCTTCTGGCTCCTCCTCGTCTCCTAGGAG
TCTTCCCCCTTCGCTGGCAGTGTGCCCCGGTCTCTTCCAGGGCGCTCCCAAGGCTGGCCCCGCTGGCT
GGATGCTGCCTTCTTACAGAGTTTCTCCAGTCTGAGACGAACCCAGAAGATGTCGCACAGCTCCCTCGG
GTCTCTCGGGGAAGCAGCTGCACCTGGGGAGCCTGCTTTGACACCTCCAAGTGTAGGGGAAAGGTCTCA
AGATCTTTGTGCACTCCCCGGCTGGTCCGACCTCTGAGGCTCAGCGCAGATCCTGGATTCTTTGGAAGG
CTCCCCGCTACTCTGCACTCAGCCCAGCAGACGCTTGCCTTCTCCTTTTTCTCCCCAGCCAGGATCGTAGA
GGAGCCTGCGGGCCCCCTGCCTCCGAACCTGGAACGGAGGCGGAACCATCTGGTGTGAGTCTCTACCCAG
CCCCCTGCACACAGGCTGGGACAGGCGATGGTAGCTGAGGCCAGCCCCCTCCTCGGACATCTTCCGACCGG
CTTCGATTTAGCGCTCCCGTATCTCCCCGAAGCTCACCCATTGCGAGGTGGGGCTCCCGGCAAGCTGCAG
CAGCAGACTCCCCAACCTGGGGCCACCTTACTGGCGGTAGCAGAGGAGAAAGGCAGGTGGCGTATCACAA
GCACCCACGCCTCAGCCTGCCTCTGGGACAGGCACCTGTGAGCAAGACCCCTGGACCCAGCAGACCTACCC
AGGAGAGACCCCTTCCCAATGCCACCTTCTGCCCTCATCCCTGGTCACCGATCTGCCACCTCCTGCTTTCTC
CAAGCCCTTCAGGCCGGCTGCATCCCCGTGCTCCTCAGCCCCCGCTGGGAGCTGCCCTTCTCTGAAGTCA
TCGACTGGACCAAGGCAGCCATCATGTGTGATGAGAGACTCCCACTGCAGGTCTGGCTGCCCTCCGTGA
AATGCTCCCTTCGAGGGTCTCGCCCTGCGCCAGCAGACCCAGTTTCTGTGGACCGCTTACTTCTCCTCG
GTGGAAAAAGTTATCCATACCAACCTAGAGATTATTCAGGACCGGATCTGGGGTGCATCAGGTACCCCT
CACTGATGTGGAATAGCCCCCGGGAGCACTCTTGGCGCTGCCACATTTTCCACGAGCCTTCAAGACTT
CCCCTTTTATCATCTGCAACTGGGCTCTGGCCCTGGGAGCAGTTTCAGCGCCGTGATCTGGGTGGGAGCC
TCTGGAGAGTCCCTGCTGAAGCTCATCCAGGAGGTGGCAGGTTCTCGGCACTGTGCCAGATCCTGATTC
TCTGGAACAGTGAGAAGCTGCCCCCTGCAGGTGGCCCCGAGACAGCAGTGCCCCTAACAGTCATCAAGGG
GCACAGGAAGGTGAGCAACCGGTTCTTCCCGTACAGCAACATCAGCACCATGTTATCCTCAGCCTTGAT
GCTCAGAGCACTCTTCTACAGTGAGGTGGACTTTGCCTTTGTGGTGTGGCAGAGCTTTCCTGAGCGGA
TGGTGGGCTTTCTGTCTGGAAGCCACTTCTGGGATGAGGCCAGGGTGGCTGGGGCTACCGTACTGGGAT
GACCAATGAGTTCTCCATGGTCTGACCACGGCTGCCTTCTACCACAGGTACTACCACACCCCTCTTACC
CACTCCCTGCCTAAGGCCCTGAGGACCATAGCTGATGAGACTCCACCTGTGTGACGTCTGATGAAC
TCCTGGTAGCCACCGTACCAAACTGCCCCCTATCAAGGTGCCCTTATGGGAGGCAGCACC CGGAGGCTGT
GCCAATGGATTCTGGGGAACACGACCAGTGCCGGAGCCTCAGCCCCCTGGATCAAGATTGTATTAATCGC
TTGGCAGCAGGGTTCGGCCACATGCCTCTGGTTTCTCTCAAGTGCCTCTGGAACCGGTGTGTCAAGG
ACCCGGTATCGGTGCAACGTAAAAAATACCGTAGCCTGGAGAAGCCA**TACCCCTATGATGTGCCAGATTA**
CGCCTAGTAA

EXTL1 Variante X1 (a partir de mRNA XM_011250306.2)

ATGTGTGCAAGCGCTGGGCTCCCCAATGACTGCCCTGCCCCCAGGCCGGCTGCATCCCCGTGCTCCTCA
GCCCCCGCTGGGAGCTGCCTTTCTCTGAAGTCATCGACTGGACCAAGGCAGCCATCATTGCTGATGAGAG
ACTCCCACTGCAGGTCTTGGCTGCCCTCCGTGAAATGCTCCCTTCGAGGGTCTCGCCCTGCGCCAGCAG
ACCCAGTTTCTGTGGACCGCTTACTTCTCCTCGGTGGAAAAAGTTATCCATACCAACCTAGAGATTATTC
AGGACCGGATCTGGGGTGCATCAGGTACCCCTCACTGATGTGGAATAGCCCCCGGGAGCACTCTTGGC
GCTGCCCACATTTTCCACGAGCCTTCAAGACTTCCCCTTTTATCATCTGCAACTGGGCTCTGGCCCTGGG
AGCAGTTTCAGCGCCGTGATCTGGGTGGGAGCCTCTGGAGAGTCCCTGCTGAAGCTCATCCAGGAGGTGG
CAGGTTCTCGGCACTGTGCCCAGATCCTGATTCTCTGGAACAGTGAGAAGCTGCCCCCTGACAGGTGGCC
CGAGACAGCAGTGCCCCCTAACAGTCATCAAGGGGCACAGGAAGGTGAGCAACCGGTTCTTCCCGTACAGC
AACATCAGCACCAATGTTATCCTCAGCCTTGATGCTCAGAGCACTCTTCTTACCAGTGAGGTGGACTTTG
CCTTTGTGGTGTGGCAGAGCTTTCCTGAGCGGATGGTGGGCTTTCTGTCTGGAAGCCACTTCTGGGATGA
GGCCAGGGTGGCTGGGGCTACCGTACTGGGATGACCAATGAGTTCTCCATGGTCTGACCACGGCTGCC
TTCTACCACAGGTACTACCACACCCCTCTTACCCACTCCCTGCCCTAAGGCCCTGAGGACCATAGCTGATG
AGACTCCCACCTGTGTGACGTCTGATGAACCTCTGGTAGCCACCGTCACCAAACTGCCCCCTATCAA
GGTGCCTTATGGGAGGCAGCACC CGGAGGCTGTGCCAATGGATTCTGGGGAACACGACCAGTGCCGGAG
CCTCAGCCCCCTGGATCAAGATTGTATTAATCGCTTGGCAGCAGGGTTCGGCCACATGCCTCTGGTTTCT
CTCAAGTGCCTCTGGACCCGGTGTGTGTTCAAGGACCCGGTATCGGTGCAACGTAAAAAATACCGTAGCCT
GGAGAAGCCATAGTAA

EXTL1-HA Variante X1

ATGTGTGCAAGCGCTGGGCTCCCCAATGACTGCCCTGCCCCCAGGCCGGCTGCATCCCCGTGCTCCTCA
 GCCCCCGCTGGGAGCTGCCTTTCTCTGAAGTCATCGACTGGACCAAGGCAGCCATCATTTGCTGATGAGAG
 ACTCCCACTGCAGGTCTTGGCTGCCCTCCGTGAAATGCTCCCTTCGAGGGTCCCTCGCCCTGCGCCAGCAG
 ACCCAGTTTCTGTGGACCGCTTACTTCTCCTCGGTGGAAAAAGTTATCCATACCACCCTAGAGATTATTC
 AGGACCGGATCTGGGGTGCATCAGGTCACCCCTCCTGATGTGGAATAGCCCCCGGGAGCACTCTTGGC
 GCTGCCCCACATTTTCCACGAGCCTTCAAGACTTCCCTTTTATCATCTGCAACTGGGCTCTGGCCCTGGG
 AGCAGTTTCAGCGCCGTGATCTGGGTGGGAGCCTCTGGAGAGTCCCTGCTGAAGCTCATCCAGGAGGTGG
 CAGGTTCTCGGCACTGTGCCAGATCCTGATTCTCTGGAACAGTGAGAAGCTGCCCCCTGACAGGTGGCC
 CGAGACAGCAGTGCCCCCTAACAGTCATCAAGGGGACAGGAAGGTCAGCAACCGGTTCTTCCCGTACAGC
 AACATCAGCACCAATGTTATCCTCAGCCTTGATGCTCAGAGCACTCTTTCTACCAGTGAGGTGGACTTTG
 CCTTTGTGGTGTGGCAGAGCTTTCTTGAGCGGATGGTGGGCTTTCTGTCTGGAAGCCACTTCTGGGATGA
 GGCCAGGGTGGCTGGGGCTACCGTACTGGGATGACCAATGAGTTCTCCATGGTCTGACCACGGCTGCC
 TTCTACCACAGGTACTACCACACCCTCTTACCCACTCCCTGCCCTAAGGCCCTGAGGACCATAGCTGATG
 AGACTCCACCTGTGTTGACGTCTGATGAACCTCTGGTAGCCACCGTCACCAAACCTGCCCCCTATCAA
 GGTGCCCTTATGGGAGGCAGCACCCGGAGGCTGTGCCAATGGATTCTGGGGA^{CCC}ACGACCAGTGCCGGAG
 CCTCAGCCCCCTGGATCA^{AGA}T^{TG}TAT^{TAA}T^{TCG}CT^{TG}GCAGCAGGGTTCGGCCACATGCCTCTGGTTTCTCT
 CTAAGTGCGTCTGGACCCGGTGTGTTCAAGGACCCGGTATCGGTGCAACG^{TAA}^{AAA}^{ATA}CCGTAGCCT
^{GG}GAGAAGCCA^{TACCCCTATGATGTGCCAGATTACGCC}TGATAA

EXTL1 Variante X2 (a partir de mRNA XM_006539058.1)

ATGCTCCCTTCGAGGGTCTCGCCCTGCGCCAGCAGACCCAGTTTCTGTGGACCGCTTACTTCTCCTCGG
 TGGAAAAAGTTATCCATACCACCCTAGAGATTATTCAGGACCGGATCTGGGGTGCATCAGGTCACCCCTC
 ACTGATGTGGAATAGCCCCCGGGAGCACTCTTGGCGCTGCCACATTTTCCACGAGCCTTCAAGACTTC
 CCCTTTTATCATCTGCAACTGGGCTCTGGCCCTGGGAGCAGTTTCAGCGCCGTGATCTGGGTGGGAGCCT
 CTGGAGAGTCCCTGCTGAAGCTCATCCAGGAGGTGGCAGGTTCTCGGCACGTGTGCCCAGATCCTGATTCT
 CTGGAACAGTGAGAAGCTGCCCCCTGACAGGTGGCCCGAGACAGCAGTGCCCCCTAACAGTCATCAAGGGG
 CACAGGAAGGTTCAGCAACCGGTTCTTCCCGTACAGCAACATCAGCACCAATGTTATCCTCAGCCTTGATG
 CTCAGAGCACTCTTTCTACCAGTGAGGTGGACTTTGCTTTGTGGTGTGGCAGAGCTTCTCTGAGCGGAT
 GGTGGGCTTTCTGTCTGGAAGCCACTTCTGGGATGAGGCCAGGGTGGCTGGGGCTACCGTACTGGGATG
 ACCAATGAGTTCTCCATGGTCTTGACCACGGCTGCCCTTCTACCACAGGTACTACCACACCCTCTTACCC
 ACTCCCTGCCTAAGGCCCTGAGGACCATAGCTGATGAGACTCCCACCTGTGTTGACGTCTGATGAACCT
 CCTGGTAGCCACCGTCACCAAACCTGCCCCCTATCAAGGTGCCCTTATGGGAGGCAGCACCCGGAGGCTGTG
^{CCAAT}GATTCTGGGGG^{ACC}ACGACCAGTGCCGGAGCCTCAGCCCCCTGGATCA^{AGA}T^{TG}TAT^{TAA}T^{TCG}CT
^{TG}GCAGCAGGGTTCGGCCACATGCCTCTGGTTTCTCTCAAGTGCGTCTGGA^{CCCG}GTGTTGTTCAAGGA
 CCCGGTATCGGTGCAACG^{TAA}^{AAA}^{ATA}CCGTAGCCT^{GG}GAGAAGCCATAG

EXTL1-HA Variante X2

ATGCTCCCTTCGAGGGTCTCGCCCTGCGCCAGCAGACCCAGTTTCTGTGGACCGCTTACTTCTCCTCGG
 TGGAAAAAGTTATCCATACCACCCTAGAGATTATTCAGGACCGGATCTGGGGTGCATCAGGTCACCCCTC
 ACTGATGTGGAATAGCCCCCGGGAGCACTCTTGGCGCTGCCACATTTTCCACGAGCCTTCAAGACTTC
 CCCTTTTATCATCTGCAACTGGGCTCTGGCCCTGGGAGCAGTTTCAGCGCCGTGATCTGGGTGGGAGCCT
 CTGGAGAGTCCCTGCTGAAGCTCATCCAGGAGGTGGCAGGTTCTCGGCACGTGTGCCCAGATCCTGATTCT
 CTGGAACAGTGAGAAGCTGCCCCCTGACAGGTGGCCCGAGACAGCAGTGCCCCCTAACAGTCATCAAGGGG
 CACAGGAAGGTTCAGCAACCGGTTCTTCCCGTACAGCAACATCAGCACCAATGTTATCCTCAGCCTTGATG
 CTCAGAGCACTCTTTCTACCAGTGAGGTGGACTTTGCTTTGTGGTGTGGCAGAGCTTCTCTGAGCGGAT
 GGTGGGCTTTCTGTCTGGAAGCCACTTCTGGGATGAGGCCAGGGTGGCTGGGGCTACCGTACTGGGATG
 ACCAATGAGTTCTCCATGGTCTTGACCACGGCTGCCCTTCTACCACAGGTACTACCACACCCTCTTACCC
 ACTCCCTGCCTAAGGCCCTGAGGACCATAGCTGATGAGACTCCCACCTGTGTTGACGTCTGATGAACCT
 CCTGGTAGCCACCGTCACCAAACCTGCCCCCTATCAAGGTGCCCTTATGGGAGGCAGCACCCGGAGGCTGTG
^{CCAAT}GATTCTGGGGG^{ACC}ACGACCAGTGCCGGAGCCTCAGCCCCCTGGATCA^{AGA}T^{TG}TAT^{TAA}T^{TCG}CT
^{TG}GCAGCAGGGTTCGGCCACATGCCTCTGGTTTCTCTCAAGTGCGTCTGGA^{CCCG}GTGTTGTTCAAGGA
 CCCGGTATCGGTGCAACG^{TAA}^{AAA}^{ATA}CCGTAGCCT^{GG}GAGAAGCCA^{TACCCCTATGATGTGCCAGATTAC}
^{GCC}TGATAA

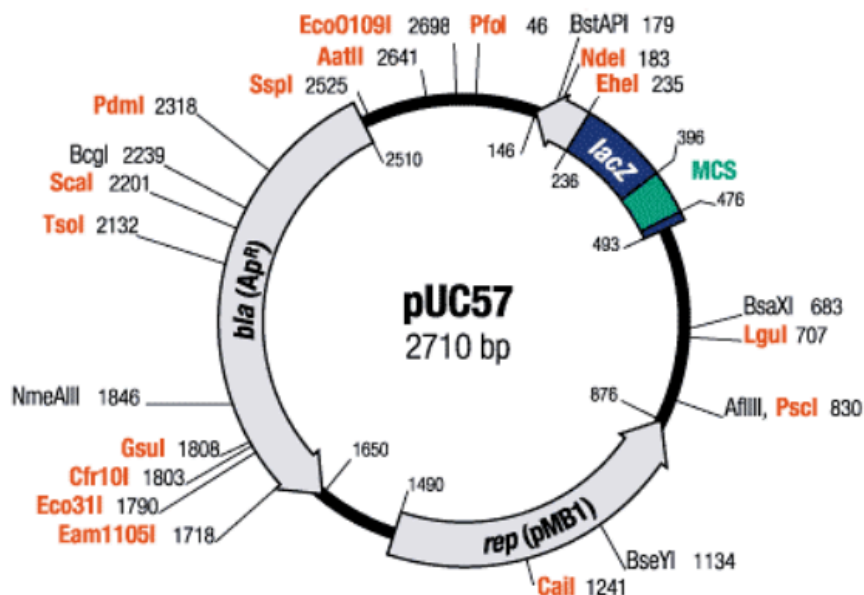
XII. PLÁSMIDOS.

Los plásmidos utilizados fueron los indicados en la siguiente tabla.

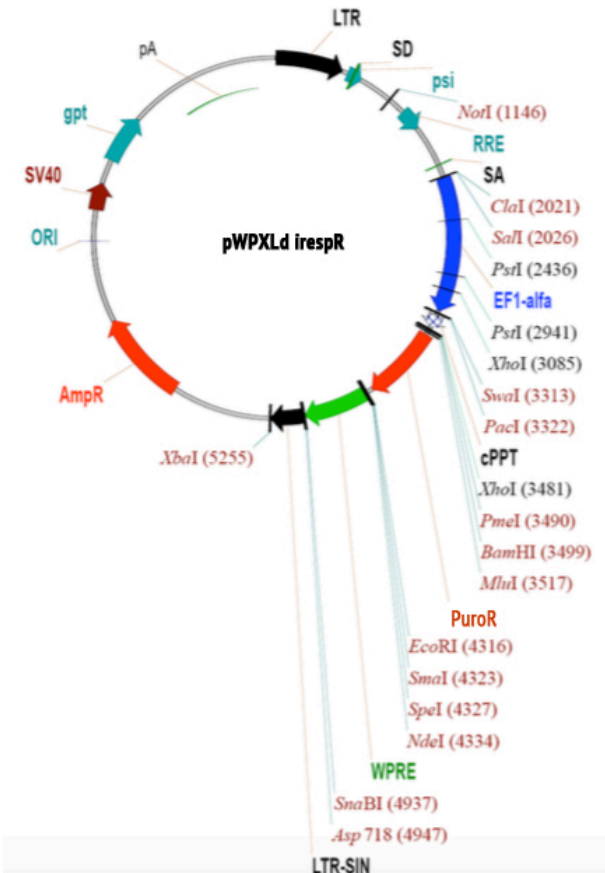
Plásmido	Resistencia bacteria	Promotor eucariotas	Selección eucariotas	Origen	Aplicación
pUC57	Ampicilina	No	No	GenSript	Clonaje
pWXPLdirespR	Ampicilina	EF1 alpha	Puromicina	Tronolab con modificaciones	Vector lentiviral para expresión en eucariotas, bicistónico con resistencia a puromicina
pTNT	Ampicilina	T7	No	Promega	Vector de expresión <i>in vitro</i>
psPAX	Ampicilina	CMVeh	No	Tronolab	Vector empaquetamiento lentiviral de 2ª generación
pMD2G	Ampicilina	CMV	No	Tronolab	Vector de envuelta lentiviral

Los mapas de dichos plásmidos se muestran a continuación:

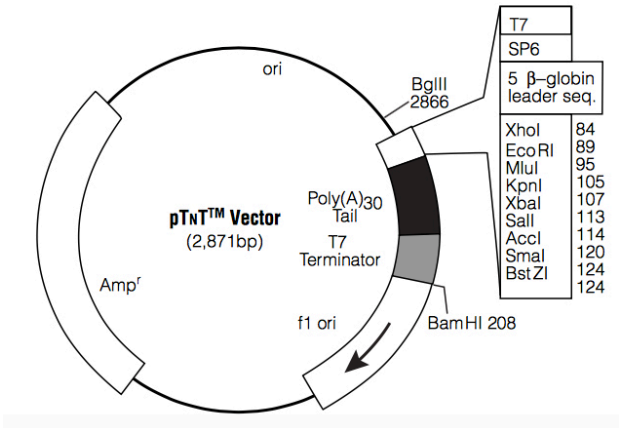
pUC57



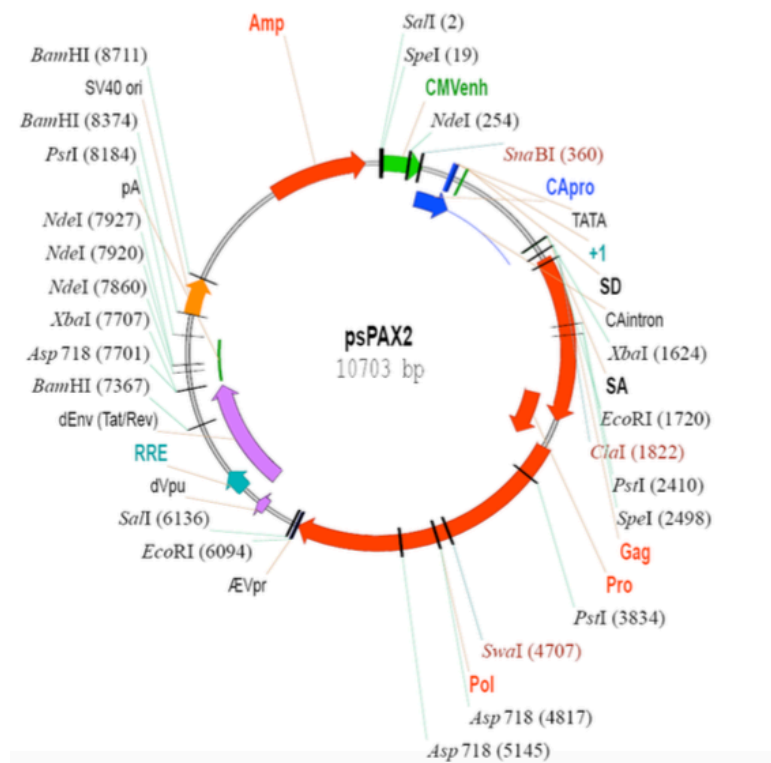
pWPXLdirespR



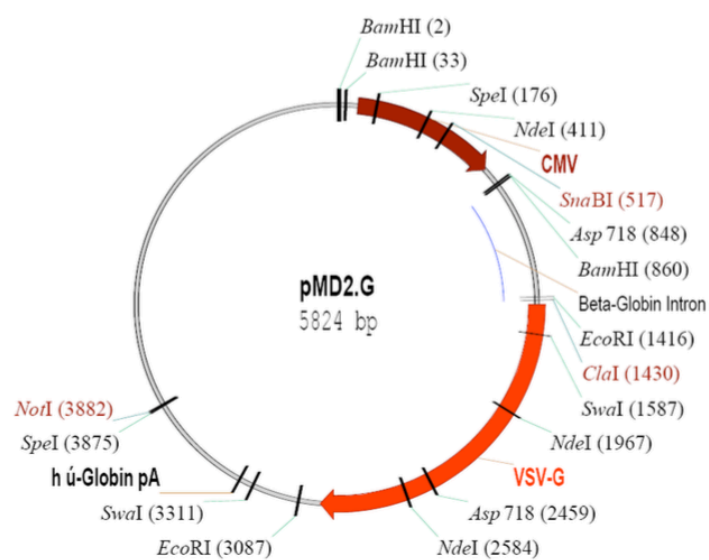
pTNT



psPAX



pMD2G



Resultados

I. Estudio del mecanismo responsable de la optimización de la entrada de electrones a la cadena de transporte

I. ESTUDIO DEL MECANISMO RESPONSABLE DE LA OPTIMIZACIÓN DE LA ENTRADA DE ELECTRONES A LA CADENA DE TRANSPORTE.

I.1. Modelos celulares.

Para investigar el mecanismo que media la degradación de CI se utilizaron tres modelos celulares en los que la inestabilidad de CI había sido previamente descrita:

- Fibroblastos carentes de citocromo b (**Cytb^{KO}**). Generados por mutagénesis aleatoria a partir de células L929. Carecen de CIII (Acín-Pérez et al 2004). Denominación de la línea celular control isogénico: **C_b**.
- Fibroblastos carentes de la chaperona COX10 (**Cox10^{KO}**), necesaria para ensamblaje de CIV. Generados por expresión de la recombinasa Cre sobre línea inmortalizada de fibroblastos de ratones *Cox10^{flox/flox}*. Carecen de CIV (Díaz et al 2006). Denominación de la línea celular control isogénico: **C₁₀**.
- Fibroblastos carentes de citocromo c (**Cytc^{KO}**). Generados por expresión de recombinasa Cre en fibroblastos inmortalizados de ratones *knockout* para citocromo c somático y citocromo c testicular, portando un transgén de citocromo c floxeado. Carecen de citocromo c y de CIV. La segunda deficiencia, por causa no descrita (Vempati et al 2007). Denominación de la línea celular control isogénico: **C_c**.

En todos ellos, la falta de un componente de la cadena ya sea CIII, Cytc o CIV produce, por un mecanismo desconocido, la pérdida de CI (Acín-Pérez et al 2004, Díaz et al 2006, Vempati et al 2009).

En principio se postuló que la carencia de CI era debida a que la presencia de CIII y CIV, ausentes en esos modelos, era necesaria para estabilizar CI por interacción física en SCs. Sin embargo, experimentos desarrollados en el laboratorio en el marco de la tesis doctoral de la Dra. Ester Perales Clemente (Universidad de Zaragoza 2009) mostraron evidencias en otro sentido. El CI podía ser reensamblado de manera funcional en células **Cytb^{KO}** y **Cox10^{KO}**, en ausencia de CIII y CIV. Esta observación tuvo lugar durante experimentos realizados con el propósito de restaurar la capacidad respiratoria en células deficientes en CIII y CIV, por medio de la expresión de la oxidasa alternativa (AOX) de *Emericella nidulans*. Esta enzima es capaz de oxidar CoQH_2 y reducir oxígeno molecular, generando una vía respiratoria alternativa a partir de CoQ. Su expresión había sido llevada a cabo con éxito en células de mamíferos previamente (Perales-Clemente et al 2008).

Las células **Cytb^{KO}** y **Cox10^{KO}** fueron capaces de reestablecer CI funcional (**Figura I.1A-B**) y respiración (**Figura I.1C-D**) por medio de la expresión de AOX. Dado que CIII y CIV seguían ausentes en las células, se testó si AOX podría actuar como estabilizador de CI por interacción física. Sin embargo, la inmunocaptura de CI a partir de células **Cytb^{KO}** AOX muestra la falta de interacción entre CI y AOX (**Figura I.1E**).

Por tanto, el mecanismo responsable de la degradación de CI en los tipos celulares **Cytb^{KO}** y **Cox10^{KO}**, guarda relación con causas funcionales y es independiente, al menos parcialmente, del hecho de que CIII y CIV sean capaces de asociarse a CI en SCs.

A continuación, se muestran los resultados arriba descritos y previos al desarrollo de esta tesis, por considerarse necesarios para ilustrar la globalidad del trabajo presentado. Las figuras han sido extraídas de la publicación en la que se muestran estos resultados, junto a

la mayoría de los contenidos en este primer apartado de *Resultados* (Guarás et al 2016). Son figuras similares a las presentes en la tesis de la Dra. Ester Perales (Universidad de Zaragoza) con ligeras modificaciones para su publicación.

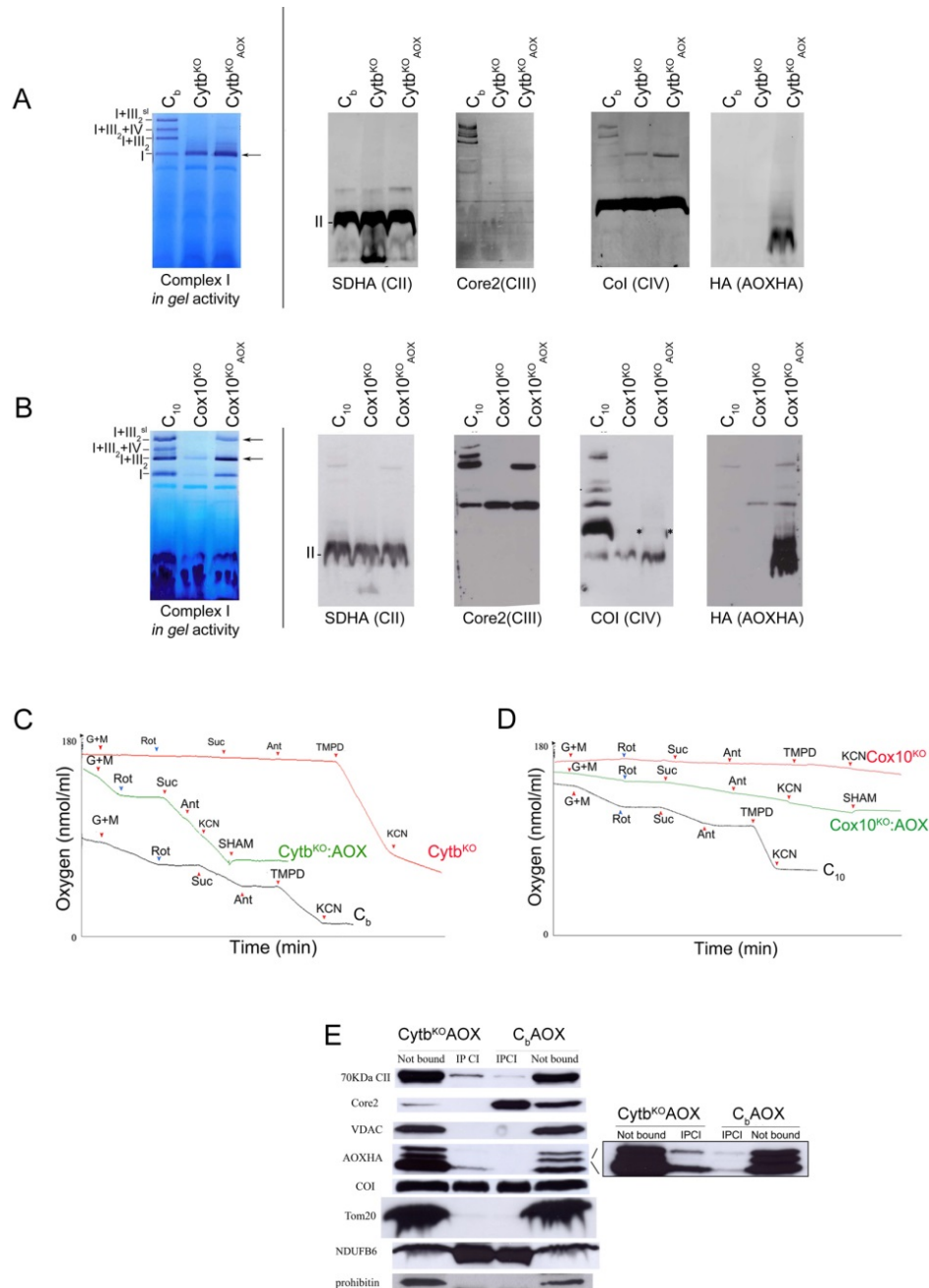


Figura 1.1: La expresión de la oxidasa alternativa (AOX) en células *Cytb*^{KO} y *Cox10*^{KO} estabiliza CI y recupera la capacidad respiratoria, sin interacción física entre AOX y CI. A-B) Detección de complejos y SCs en mitocondrias digitonizadas tras electroforesis BN-PAGE por medio de ensayo de actividad en gel (izquierda) o por western blot (derecha) con los anticuerpos contra las proteínas indicadas. Las bandas con CI restaurado por expresión de AOX están indicadas con flechas. El asterisco indica la ausencia de CIV. La caracterización de la composición en complejos muestra la estabilización de CI funcional por expresión de AOX en células carentes de CIII (*Cytb*^{KO}) y CIV (*Cox10*^{KO}). **C**) Consumo de oxígeno en células carentes de CIII (*Cytb*^{KO}), mismas células expresando AOX (*Cytb*^{KO} AOX) y su control isogénico (*C_b*). **D**) Consumo de oxígeno en células carentes de CIV (*Cox10*^{KO}), mismas células expresando AOX (*Cox10*^{KO} AOX) y su control isogénico (*C₁₀*). **C-D**) La expresión de AOX es capaz de reestablecer la respiración, sólo sensible al inhibidor de AOX, SHAM. Las flechas rojas indican adición de sustratos: G+M (glutamato+malato), Suc (succinato), TMPD (N, N, N, N'-tetrametil-p-fenilendiamina) e inhibidores: Rot (rotenona), Ant (antimicina), KCN (cianuro de potasio), SHAM (ácido salicilhidroxámico). **E**) Resolución de inmunocaptura de CI, por electroforesis SDS y western blot revelando las proteínas indicadas, en células deficientes en CIII y su control isogénico, ambas expresando AOX. El eluido (IP CI) muestra que la mayor parte de AOX no se encuentra unida a CI (Tesis doctoral Ester Perales Clemente. Universidad de Zaragoza 2009. Con modificaciones).

1.1.1 Caracterización del efecto de la expresión de la oxidasa alternativa (AOX) de *Emericella nidulans* en células de ratón deficientes en citocromo c.

Antes de profundizar en la búsqueda del mecanismo implicado en la degradación de CI, fue necesario caracterizar si el tercer modelo, Cyt^{KO} , respondía de igual manera a la expresión de AOX. Esa caracterización fue el primer paso en el desarrollo de la presente tesis doctoral.

Las células Cyt^{KO} presentan ausencia de CIV (**Figura 1.2 C-D**). El mecanismo que media la pérdida de CIV no ha sido descrito ni fue objeto de estudio en esta tesis. Del mismo modo que en los otros modelos celulares, Cyt^{KO} y Cox10^{KO} , la pérdida de componentes de la cadena respiratoria conlleva la degradación de CI, a pesar de no presentar deficiencia en componentes o factores necesarios para el ensamblaje del complejo.

Si la deficiencia en CI es debida a la carencia de Cyt^{KO} o a la pérdida secundaria de CIV, es una pregunta que sólo puede ser respondida una vez dilucidado el mecanismo que media la degradación de CI.

En efecto, la expresión estable de AOX en células Cyt^{KO} reprodujo el comportamiento previamente descrito en las líneas Cyt^{KO} y Cox10^{KO} . La expresión de AOX, localizada en mitocondria (**Figura 1.2A-B**), produjo la estabilización de CI en forma de SC I+III₂ y CI libre, con actividad NADH deshidrogenasa revelada por ensayo de actividad en gel (**Figura 1.2 C**). La expresión de AOX y la restauración de CI ensamblado, no tuvieron efecto sobre los niveles de CIV, que permaneció ausente (**Figura 1.2C**). Al mismo tiempo, y como era de esperar por resultados previos de inmunocaptura de CI en células Cyt^{KO} (**Figura 1.1E**), la electroforesis en condiciones nativas mostró falta de interacción entre AOX y complejos respiratorios, lo que descarta una vez más que la restauración de CI pueda ser debida a interacción física del complejo con otros componentes de la cadena (**Figura 1.2 C**).

Para analizar el efecto de AOX sobre los complejos respiratorios en más profundidad, se realizó el marcaje específico de subunidades codificadas en DNA mitocondrial con dos horas de pulso con [³⁵S] metionina – cisteína. Tras 14 horas de periodo de caza, para permitir la incorporación de las proteínas marcadas en complejos respiratorios, se llevó a cabo su resolución por 2D BN-SDS-PAGE. En experimentos previos, las células Cyt^{KO} y Cox10^{KO} habían presentado marcaje de intermediarios de ensamblaje o productos de degradación de CI, cuya acumulación era prevenida con la expresión de AOX, (resultados previos no mostrados). En el caso de Cyt^{KO} la acumulación de estos subcomplejos de CI no era tan obvia, lo que sugiere una rápida degradación de éstos. En cualquier caso, el marcaje de las subunidades de CI es claramente restaurado con la expresión de AOX, a nivel de CI ensamblado. Tanto Cyt^{KO} como Cyt^{KO} AOX presentaron marcaje de una sola de las tres subunidades de CIV codificadas en DNA mitocondrial, COI, lo que sugirió la formación de un intermediario de ensamblaje o degradación de CIV, el cual resultó insensible a la expresión de AOX (**Figura 1.2D**).

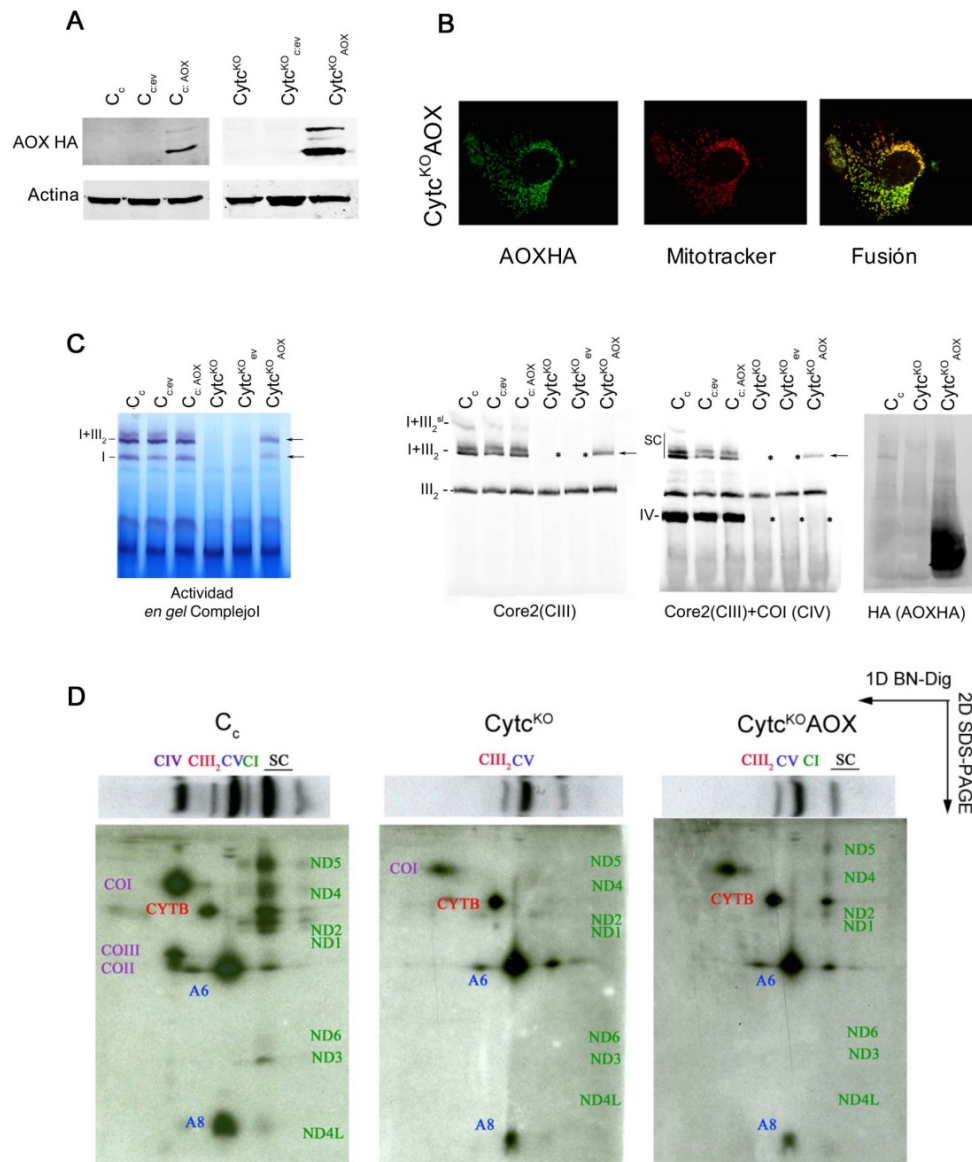


Figura 1.2: La expresión de la oxidasa alternativa (AOX) en células Cytc^{KO} estabiliza CI funcional en ausencia de CIV. **A)** Expresión de AOX testada por western blot tras SDS-PAGE en células C_c (control isogénico) y Cytc^{KO} (carentes de Cytc y CIV). Se muestra resultado para células sin transfectar, transfectadas con vector sin constructo (ev) o con vector para la expresión de AOX con epítipo HA (AOX). La expresión se revela con anticuerpo anti HA. Actina como control de carga. **B)** Localización subcelular de AOX en células Cytc^{KO}AOX. AOX fue inmunodetectado con anticuerpo anti HA y la localización mitocondrial confirmada por colocación con *Mitotracker red*. **C)** El efecto de la expresión de AOX sobre ensamblaje de complejos respiratorios fue testado por la detección de complejos y SCs en mitocondria solubilizada con digitonina por BN-PAGE, por ensayo de actividad en gel de CI (izquierda) o por western blot con los anticuerpos indicados (derecha). Las bandas correspondientes a la restauración de CI en forma libre o SCs están indicadas con flechas. La carencia de CI y CIV en western blot están indicadas con asteriscos. CIV no es restaurado por expresión de AOX. AOXHA presenta patrón de migración no asociado a complejos respiratorios. **D)** Análisis detallado del efecto de la expresión de AOX sobre el ensamblaje de complejos respiratorios por 1D y 2D BN-PAGE a partir de mitocondria con proteínas codificadas en DNA mitocondrial marcadas con ³⁵S.

Por último, se testó la funcionalidad tanto de AOX como del CI reestabilizado. El análisis de consumo de oxígeno por electrodo de Clark mostró la restauración de la capacidad respiratoria de las células Cytc^{KO} tras la expresión de AOX, tanto con adición de sustrato de CI (glutamato+malato) como por adición de sustrato de CII (succinato). Dicha respiración fue sólo sensible al inhibidor de AOX ácido salicilhidroxámico, demostrando que las células Cytc^{KO} ven restaurado el flujo de electrones en la cadena respiratoria a través de AOX (**Figura 1.3**).

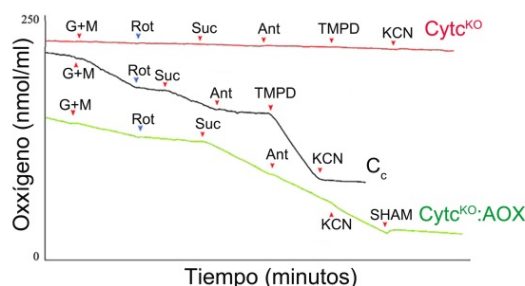


Figura I.3: La expresión de la oxidasa alternativa (AOX) en células $Cytc^{KO}$ restaura la capacidad respiratoria a través de CI y CII en ausencia de CIV. Análisis de consumo de oxígeno de células $Cytc^{KO}$, $Cytc^{KO}$ expresando AOX ($Cytc^{KO}:AOX$) y su control isogénico C_c . Las células control C_c son capaces de respirar a partir de sustratos de CI (G+M), CII (Succ) y CIV (TMPD), siendo esta respiración sensible a inhibidores de CIII (Ant) y CIV (KCN). Las células $Cytc^{KO}$ no poseen capacidad respiratoria debido a la carencia de CIV. La expresión de AOX hace que células $Cytc^{KO}:AOX$ sean capaces de respirar por sustratos de CI y CII a través de AOX, lo cual es deducible de la sensibilidad al inhibidor de AOX (SHAM). Las flechas rojas indican adición de sustratos: G+M (glutamato+malato), Suc (succinato), TMPD (N, N, N, N'-tetrametil-p-fenilendiamina) e inhibidores: Rot (rotenona), Ant (antimicina), KCN (cianuro de potasio), SHAM (ácido salicilhidroxámico).

I.2. Estudio del mecanismo responsable de la degradación de CI en células $Cytb^{KO}$, $Cox10^{KO}$ y $Cytc^{KO}$.

La reevaluación del ensamblaje de complejos y SCs por BN-PAGE en los dos modelos celulares de degradación de CI caracterizados previamente a esta tesis, mostró que las células $Cytb^{KO}$, tras años de cultivo y congelación, por algún motivo habían incrementado su cantidad de CI, aunque no al nivel de las células control (la nueva generación de esta línea no es posible ya se creó por mutagénesis aleatoria afectando a un gen codificado en DNA mitocondrial). La expresión de AOX incrementaba la cantidad de CI, indicando que el fenómeno de estabilización de CI también tenía lugar en estas condiciones (**Figura I.4**). En la figura I.4 se muestra la evaluación de ensamblaje de complejos y SCs respiratorios en los tres modelos de estudio al comienzo de esta tesis. Nótese que las células control para $Cytc^{KO}$, C_c , no incorporan CIV en SCs, dado que derivan de ratones C57BL/6J, los cuales portan mutación en SCAF1, factor de ensamblaje responsable de la asociación entre CIII y CIV (Lapiente-Brun et al 2013).

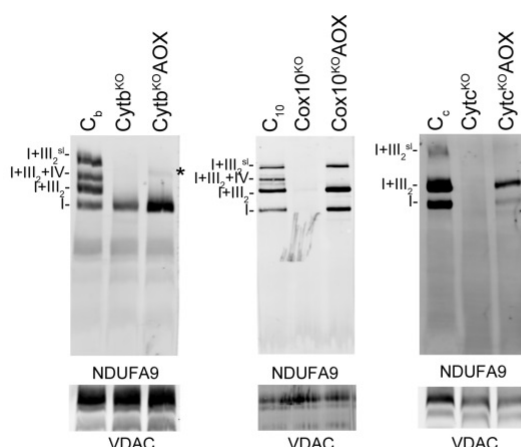


Figura I.4: Caracterización del ensamblaje de CI en los modelos celulares utilizados en el estudio. Análisis del ensamblaje de complejos y SCs respiratorios en mitocondria solubilizada con digitonina por BN-PAGE y western blot con los anticuerpos indicados. VDAC es utilizado como control de carga. Modelos celulares: $Cytb^{KO}$ (carente de CIII), misma línea celular expresando AOX ($Cytb^{KO}:AOX$) y control isogénico (C_b). $Cox10^{KO}$ (carente de CIV), misma línea celular expresando AOX ($Cox10^{KO}:AOX$) y control isogénico (C_{10}). $Cytc^{KO}$, misma línea celular expresando AOX ($Cytc^{KO}:AOX$) y control isogénico (C_c). El asterisco indica una nueva banda que contiene CI sin CIII ni CIV, no estudiada en mayor profundidad.

1.2.1. Evaluación del importe de proteínas por vía MIA40 en ausencia de CIII, Cit c y CIV.

La hipótesis propuesta hasta el momento para explicar la degradación de CI en células carentes de CIII, Cit c y CIV era que la pérdida de CIII y CIV impedía la estabilización de CI por interacción física (Acín-Pérez et al 2004). Una vez confirmado que el fenómeno de estabilización de CI en ausencia de CIII o CIV era reproducible en nuestros tres modelos celulares, se evaluaron hipótesis alternativas para explicar la degradación de CI.

Una opción a descartar, fue la posibilidad de que la carencia de Cit c o, de forma indirecta, su falta de oxidación por ausencia de CIV produjera un fallo en la vía de importe MIA40. Esta vía es utilizada por proteínas de espacio intermembrana, con residuos de cisteína, para la formación de puentes disulfuro, y sus aceptores últimos de electrones son citocromo c y CIV (Chatzi et al 2016). Fue postulado que tres subunidades de CI contienen los motivos CX₉C propios de las proteínas estabilizadas por esta vía, NDUFS5, NDUFB7 y NDUFA8 (Szklarczyk et al 2011). Se evaluó si el CI estabilizado por AOX en ausencia de CIII, Cit c y CIV contenía dichas subunidades. Dado que en los tres modelos celulares expresando AOX se encontraron las proteínas asociadas a CI en BN-PAGE de mitocondrias solubilizadas con digitonina, dicha hipótesis fue descartada (**Figura I.5**).

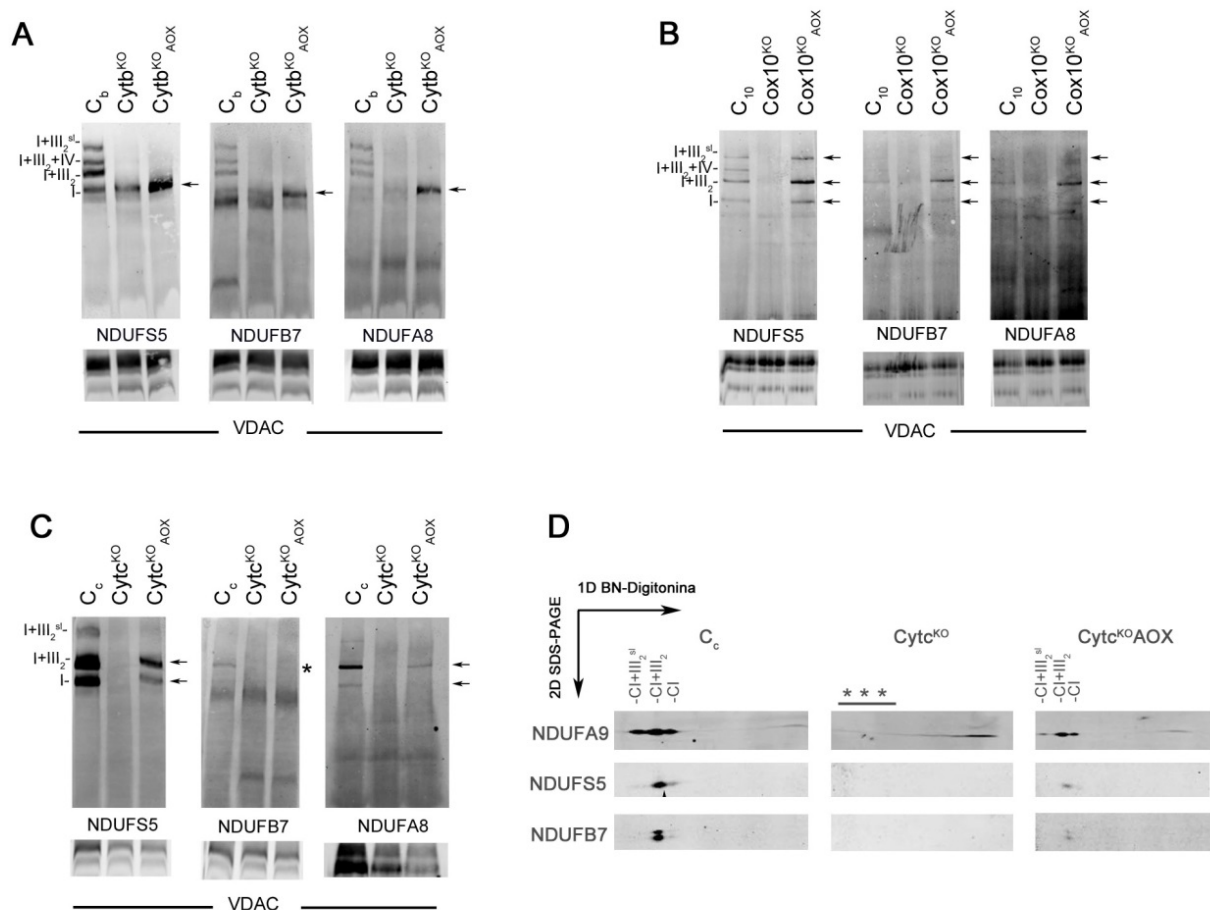


Figura I.5: La presencia de proteínas con dominio CX₉C en el CI restaurado por AOX, en ausencia de CIII, Cit c o CIV, sugiere no afectación de la vía de importe Mia40. A-C) Análisis del ensamblaje de complejos y SCs respiratorios en mitocondria solubilizada con digitonina por BN-PAGE y western blot con los anticuerpos indicados. VDAC es utilizado como control de carga. Las flechas indican banda de CI restaurado en células mutantes, que contiene la proteína de interés. El asterisco en C) indica falta de banda esperada de CI conteniendo NDUFB7, presumiblemente por falta de accesibilidad del anticuerpo al epítipo en electroforesis nativa. Dicha limitación es salvada resolviendo las proteínas individuales en 2ª dimensión SDS-PAGE a partir de 1ª dimensión BN-PAGE en D). **D)** 2ª dimensión SDS-PAGE resolviendo proteínas individuales contenidas en complejos y SCs resueltos en 1ª dimensión BN-Digitonina, como en C). Con esta técnica, es posible revelar la presencia de NDUFB7 en CI de Cyt^{KO}AOX. Los asteriscos indican falta de CI y SCs en Cyt^{KO}.

1.2.2. Evaluación del estado redox de la CoQ en células carentes de CIII, Cytc y CIV y efecto de la expresión de AOX.

La primera consecuencia para las células de la falta de CIII, Cytc y CIV es el bloqueo de la oxidación de CoQH_2 (Figura 1.6B), deteniendo todas las enzimas dependientes de CoQ. Como resultado, se impide la oxidación de NADH por CI (de la matriz mitocondrial) y G3PDH (del citoplasma) es bloqueada, el ciclo de Krebs no puede progresar desde succinato a fumarato y se detiene la β -oxidación. Este desequilibrio podría disparar rutas de señalización para la degradación de CI.

Dado que la expresión de AOX es capaz de restaurar CI y capacidad respiratoria en nuestros modelos; decidimos investigar si el estado redox de CoQ estaba relacionado con la degradación de CI. Para ello se cuantificaron los niveles de CoQ_9 , oxidada y reducida, en mitocondria aislada de células control, mutantes y mutantes expresando AOX. La expresión de AOX restauró un ratio normal de $\text{CoQH}_2:\text{CoQ}$ (Figura 1.6B), sin inducir grandes cambios en el contenido total de CoQ (Figura 1.6C) al mismo tiempo que se restauraba la capacidad respiratoria (Figura 1.6A). Nótese que la restauración del ratio $\text{CoQH}_2:\text{CoQ}$ es posible con niveles de respiración basal mucho menores a los de células control.

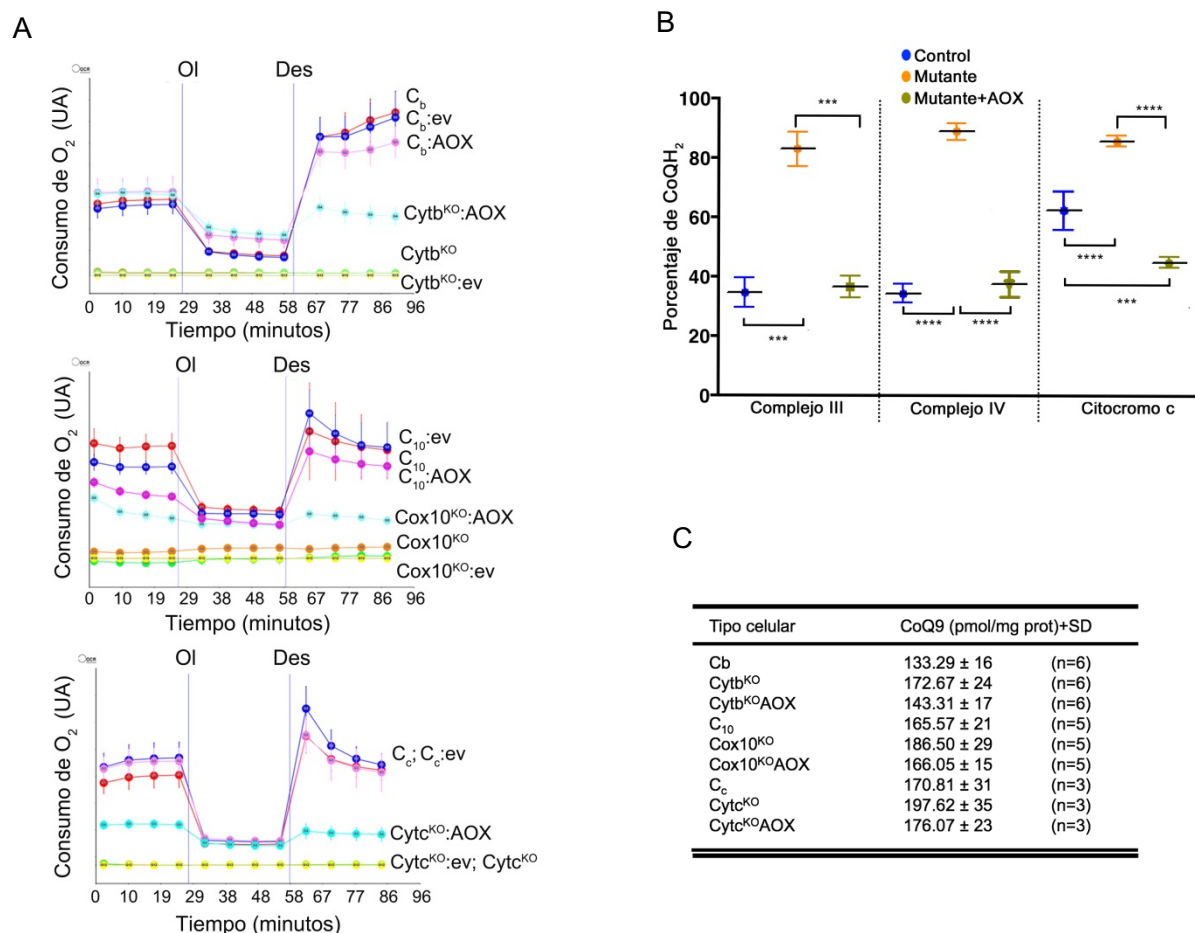


Figura 1.6: La recuperación de la capacidad respiratoria, debida a la expresión de AOX, restaura el ratio $\text{CoQH}_2 : \text{CoQ}$ en ausencia de CIII, Cytc o CIV. A) Consumo de oxígeno en las líneas celulares indicadas. Líneas verticales indican la adición de oligomicina (OI) o desacoplante (Des); C_b, C₁₀ y C_c, controles isogénicos; ev, expresión de vector vacío. **B)** Porcentaje estimado de CoQH_2 en células mutantes *versus* control isogénico y efecto de expresión de AOX. Datos son media ±SD; (n=3-6) (**p< 0.001; ****p<0.0001, Test HSD de Tukey). **C)** Cantidad de CoQ_9 total (oxidada+reducida) en mitocondria de las líneas celulares mostradas.

1.2.3. Evaluación de la interacción entre CoQH₂ y CI, como fenómeno implicado en el mecanismo de degradación.

Al restaurar el flujo de electrones, la ratio NAD⁺/NADH, la función del ciclo de Krebs y el estado redox de CoQ son normalizados. Para determinar si la desestabilización de CI requiere interacción con CoQ en condiciones en que el flujo de electrones no ha sido restaurado, bloqueamos la posible interacción por medio de la adición de rotenona, la cual compite con la ubiquinona por unión a CI (Murphy 2009). Las concentraciones de rotenona mayores a 0,25μM poseen efectos tóxicos no relacionados con la cadena respiratoria (G Hofhaus and Attardi 1995). Por ello, inicialmente se investigó el impacto de las concentraciones de rotenona mínimas con efecto inhibitorio sobre el CI. A esas concentraciones, la rotenona tuvo un efecto estabilizador de CI en los modelos carentes de CIV (Cox10^{KO} y Cyt^{KO}), si bien menor que lo observado tras expresión de AOX (**Figura 1.7A y B**).

Se testaron otros inhibidores de CI, como piericidina A, también capaz de competir con CoQ por la unión a CI (Okun et al 1999), y cloruro de difenileno iodonium (DPI), inhibidor de CI a nivel de la coenzima flavin mononucleotido (Lambert et al 2008). La piericidina A estabilizó CI también débilmente, mientras que DPI no produjo efecto alguno en CI de células mutantes (**Figura 1.7C izquierda**).

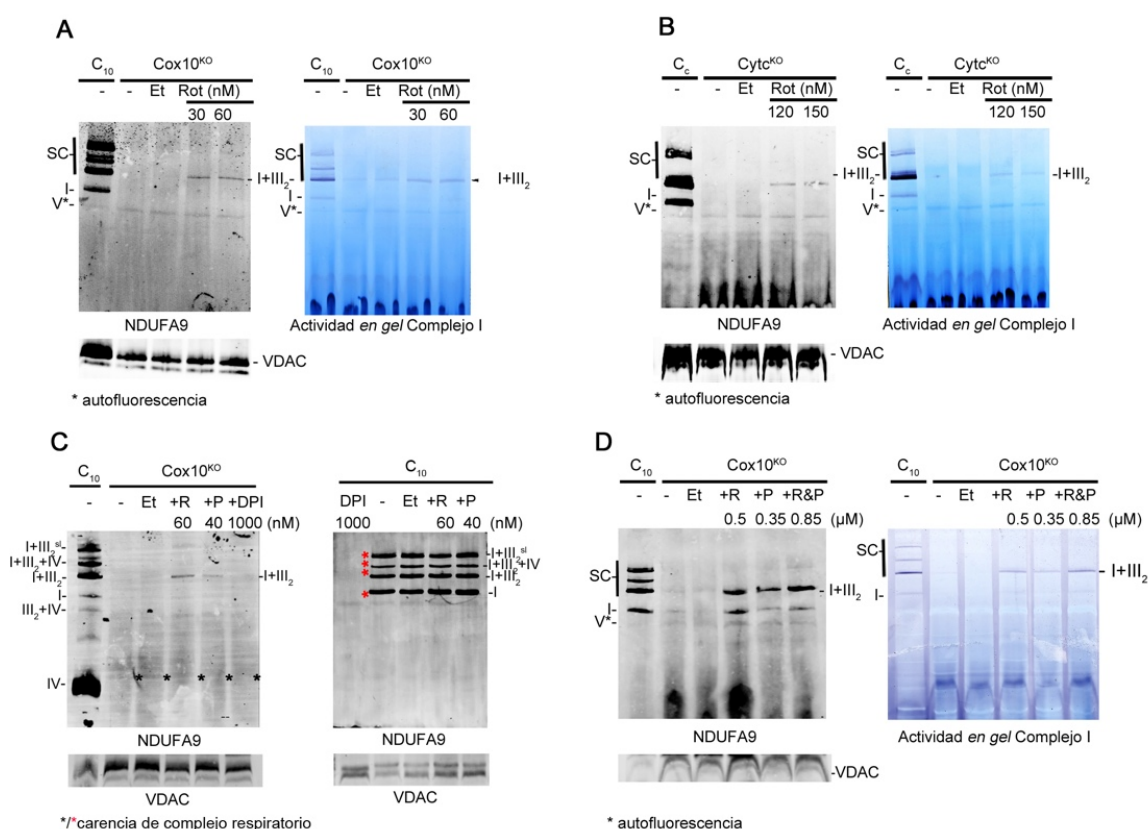


Figura 1.7: El bloqueo de la interacción entre CI y CoQH₂ estabiliza CI en ausencia de Cyt^{KO} y CIV. A-D) Células deficientes en CIV (Cox10^{KO}), o su control isogénico (C₁₀) fueron tratadas por 48 horas con la concentración indicada de rotenona (Rot o R), piericidina A (P) o vehículo (Et). C) Células deficientes en Cit c (Cyt^{KO}) o su control isogénico (C_c) fueron tratadas por 48 horas con la concentración indicada de rotenona (Rot). **A, B, D paneles a la izquierda y C)** Western blot tras BN-PAGE en mitocondrias solubilizadas con digitonina revelado con anticuerpo anti NDUF9 (CI) o control de carga (VDAC). **A, B y D paneles a la derecha)** Ensayo de actividad de CI en gel tras BN-PAGE en mitocondrias solubilizadas con digitonina.

Las mismas dosis de rotenona y piericidina A capaces de estabilizar CI en mutantes Cox10^{KO} y Cyt^{KO}, no tuvieron efecto alguno sobre la estabilidad de CI en células control (**Figura I.7C derecha**). Sin embargo, un fenómeno totalmente inesperado, que en principio no guarda relación con los fines de este estudio, fue la desestabilización total de CI en células control tratadas con una concentración de DPI usualmente utilizada en la literatura para inhibición de CI y otras NAD(P)H oxidasas (**Figura I.7C derecha**). La caracterización de dicho efecto tiene lugar al final de este apartado (Ver apartado *I.4. Caracterización del efecto del difenilo iodonium sobre la estabilidad del CI*).

Cuando la concentración de rotenona fue incrementada a 500nM, o cuando se utilizó también en dosis altas piericidina, se observó un efecto mucho mayor sobre la estabilización de CI en células Cox10^{KO} (**Figura I.7D**).

Estos resultados confirman la importancia de la interacción entre CoQH₂ y CI en la degradación de CI, en ausencia de Cit c y CIV, por lo que postulamos que algún efecto derivado del transporte reverso de electrones podría estar implicado en la degradación de CI. Cuando la proporción de CoQH₂ es muy alta, debido a que los electrones no pueden fluir hacia delante a través de CIII, Cyt c o CIV, se produce el efecto conocido como transporte reverso de electrones (RET), de modo que los electrones fluyen de nuevo hasta CI. El RET puede ser inducido por succinato, α -glicerol fosfato o β -oxidación y es crítico en la lesión post-isquemia (Chouchani et al 2014). Cuando RET es inducido, el CI produce cantidades elevadas de superóxido, lo cual es evitado con la presencia de rotenona (Murphy 2009).

I.2.3. Evaluación de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) vía transporte reverso de electrones (RET) como fenómeno implicado en el mecanismo de degradación.

Dadas las evidencias de que el RET estaba mediando la degradación de CI, se testó la implicación de ROS en dicho proceso. La sobreexpresión de la enzima superóxido dismutasa mitocondrial (SOD2) en células Cox10^{KO} estabilizó CI sólo débilmente (**Figura I.8**), tal vez reflejando la dificultad para la enzima de acceder y eliminar el ROS generado en CI antes de causar el daño oxidativo que conduce a la degradación de CI (Murphy 2009).

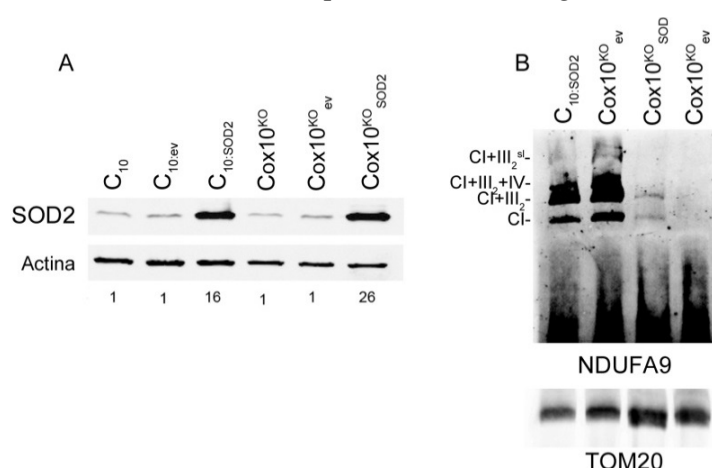


Figura I.8: La expresión de SOD2 estabiliza, aunque débilmente, CI en células Cox10^{KO}. **A)** Test de sobreexpresión de superóxido dismutasa mitocondrial (SOD2) por western blot tras SDS-PAGE, en células Cox10^{KO} y control isogénico (C₁₀), ev: vector vacío. Los dígitos indican el número de veces en que la expresión de SOD2 se ve incrementada en relación a la línea celular control. Actina como control de carga. **B)** Western blot tras BN-PAGE de mitocondrias tratadas con digitonina, revelado con anticuerpo anti NDUF9 (CI) y TOM20 como control de carga.

Como estrategia alternativa para reducir ROS de manera global, se examinó el efecto del cultivo celular, por largos tiempos a baja concentración de oxígeno, sobre la estabilización de CI en los modelos mutantes. Mientras que la hipoxia aguda, producida en el orden de minutos, induce la producción de ROS mitocondrial, la hipoxia a largo plazo la previene (Hernansanz-Agustín et al 2014).

El cultivo en atmósfera con 1% de oxígeno, por más de 24 horas, estabilizó el CI en células Cox10^{KO}, en ausencia de CIV (**Figura I.9A**). La influencia de la concentración de oxígeno fue confirmada exponiendo las células Cox10^{KO}, cultivadas a 1% de oxígeno durante 72 horas, a diferentes periodos de reoxigenación a 21% de oxígeno (1, 4 y 7 horas). Tras la reoxigenación, el CI estabilizado por hipoxia se volvió inestable de nuevo (**Figura I.9B**),

El cultivo de células Cyt^{KO}, a 1% de oxígeno, indujo también estabilización del CI, más débil, pero todavía significativa, sin afectar a la ausencia de CIV (**Figura I.9C**).

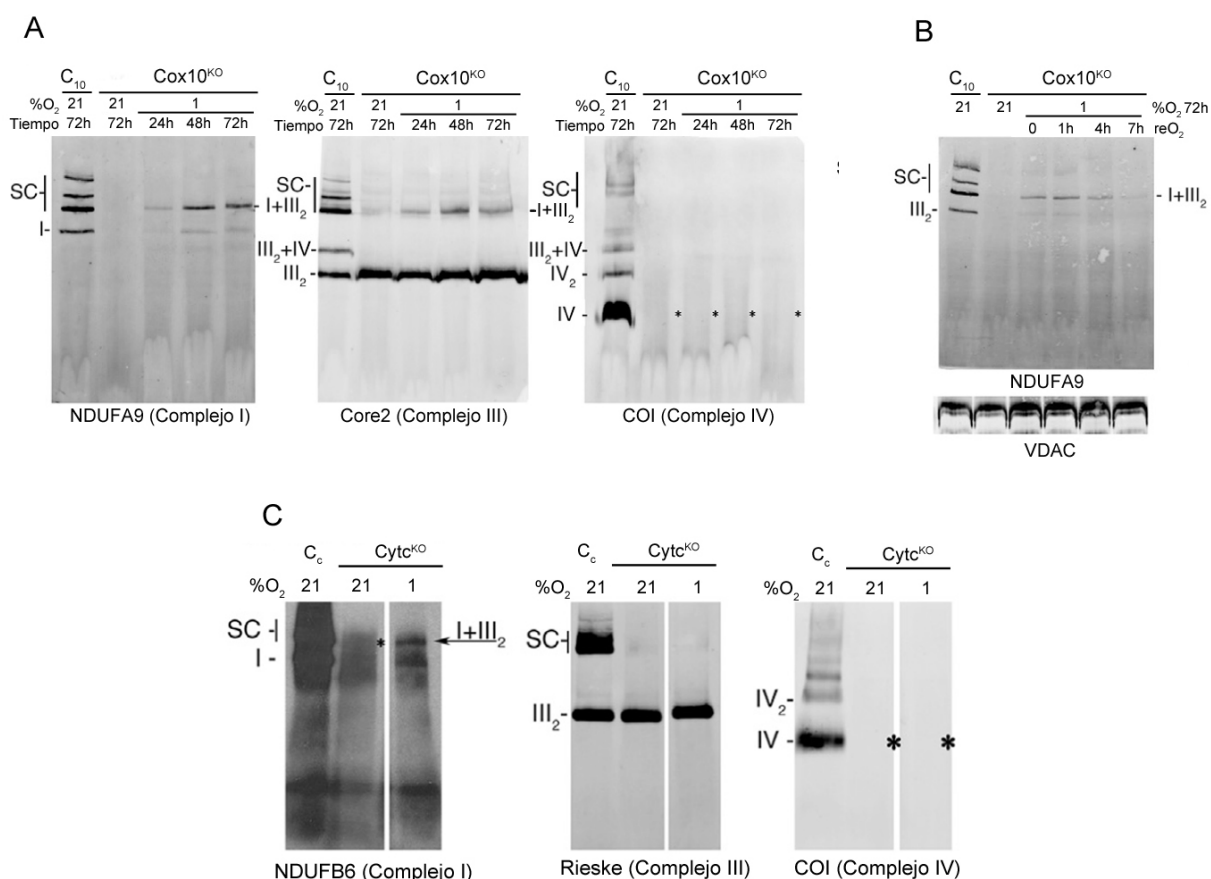


Figura I.9: El cultivo en atmósfera con 1% de oxígeno estabiliza CI en ausencia de Cit c y CIV. A-C) Western blot tras BN-PAGE de mitocondrias solubilizadas con digitonina. **A)** Western blot para células Cox10^{KO} y células control (C₁₀) cultivadas a porcentaje de oxígeno (21 o 1) y tiempo (horas) indicados. Cada panel muestra el revelado de un complejo respiratorio diferente, en mismas condiciones, con el anticuerpo indicado. Los asteriscos muestran ausencia de CIV en células KO. **B)** Western blot para células Cox10^{KO} cultivadas por 72 horas y expuestas a reoxigenación (reO₂) las horas indicadas. Anticuerpo anti NDUF9 para revelar CI y VDAC como control de carga. **C)** Western blot para células Cyt^{KO} cultivadas a % de oxígeno indicado (%O₂), durante 72 horas. Cada panel muestra el revelado de un complejo respiratorio diferente, en mismas condiciones, con el anticuerpo indicado. Los asteriscos muestran ausencia de CIV en células KO.

La estabilización de CI, observada por cultivo en condiciones de hipoxia, no fue mediada por la disminución en la acumulación de CoQH₂, como se deduce de las medidas de porcentaje de CoQH₂ a diferentes tiempos de cultivo a 1% de oxígeno (**Figura I.10A**).

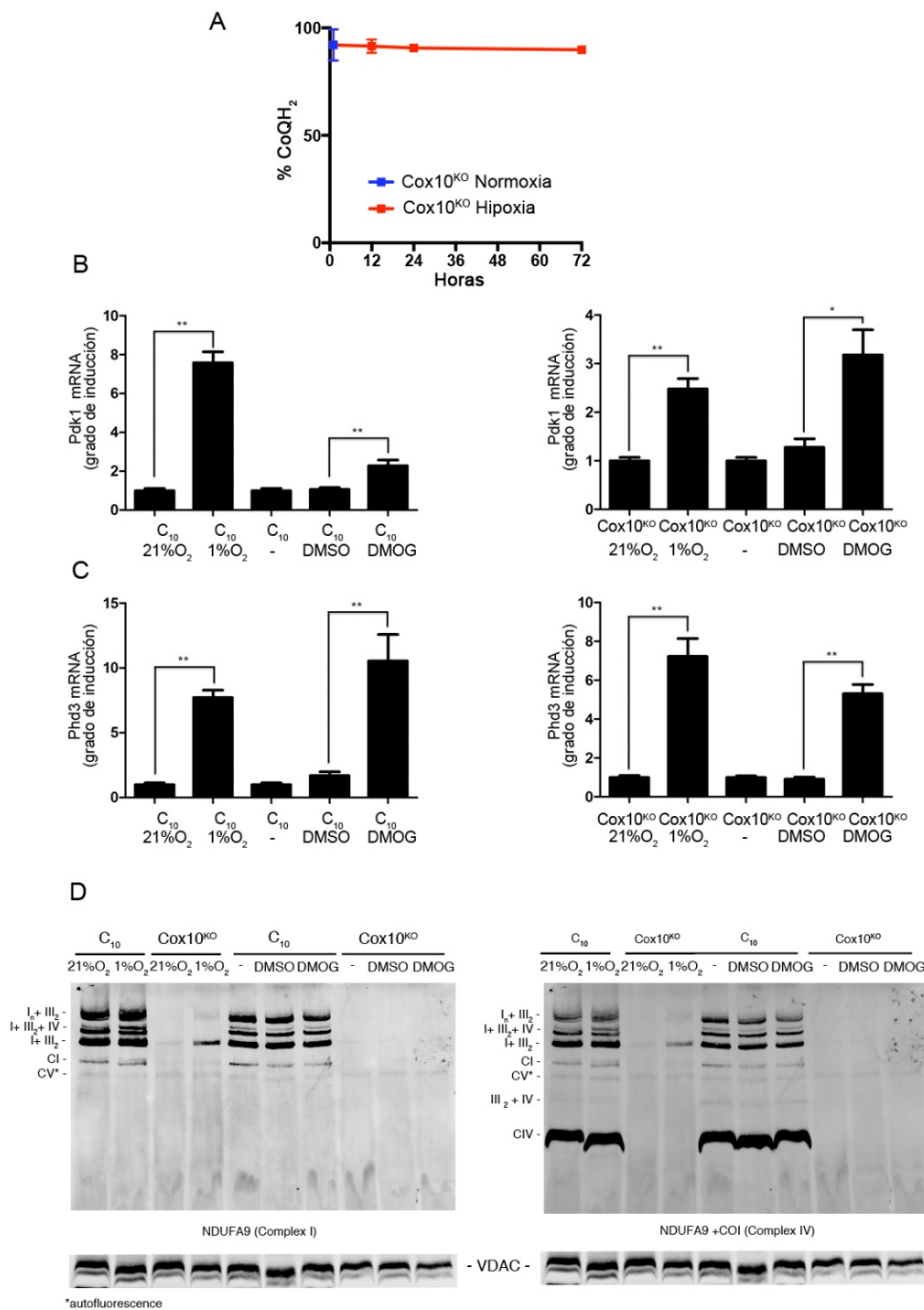


Figura I.10: La estabilización de CI en células Cox10^{KO} cultivadas en atmósfera a 1% de oxígeno es HIF-1α independiente. **A)** La gráfica muestra el porcentaje de CoQ reducida en células Cox10^{KO} tras cultivo en normoxia (azul) o tras su cambio a cultivo en hipoxia a distintos tiempos (rojo). Media \pm SD (n=3). **B-C)** Análisis de la expresión de los genes diana de HIF-1α, piruvato deshidrogenasa quinasa 1 (Pdk1) y prolina hidroxilasa 3 (Phd3), por medio de PCR cuantitativa, como control de estabilización de HIF-1. Análisis realizado en células control (C₁₀) y células mutantes (Cox10^{KO}), cultivadas a 1% versus 21% de oxígeno 72 horas (dos primeras barras de cada gráfica) y cultivadas sin tratar (-) versus tratadas con vehículo (DMSO) versus tratadas con DMOG (0,5mM) por 72 horas en condiciones de normoxia (tres barras a la derecha en cada gráfica). Datos son media \pm SEM; (n \geq 3) (*p< 0.05; Wilcoxon test). **D)** BN-PAGE y western blot de mitocondrias solubilizadas con digitonina correspondientes a las muestra de uno de los experimentos en B-C. La presencia o ausencia de CI y CIV fueron reveladas con los anticuerpos indicados. VDAC como control de carga. La señal de CV es debida a la autofluorescencia revelada al generar la imagen del blot por *Odissey infrared imaging*.

La exposición a condiciones de hipoxia induce respuesta transcripcional por medio de la estabilización de factores de transcripción (Koh and Powis 2012). Para determinar si el programa transcripcional dependiente de HIF-1 α estaba influyendo en la estabilización de CI inducida por hipoxia o en la degradación de CI inducida por reoxigenación, estabilizamos HIF-1 α en células cultivadas a 21% de oxígeno. Para ello las células fueron tratadas con dimetiloxalil glicina (DMOG), un inhibidor de prolil hidroxilasas (PHF) y del factor inhibidor de HIF (FIH-1), capaz de incrementar los niveles de HIF-1 α . Tras 72 horas de exposición a DMOG o hipoxia, el programa de transcripción dependiente de HIF-1 α se activó en células Cox10^{KO} y células control, como se deduce del incremento de la expresión de genes diana de HIF-1 α , *Pdk1* y *Phd3* (Figura I.10B-C). Sin embargo, la activación del programa transcripcional de HIF-1 α por DMOG en normoxia no estabilizó CI, demostrando que estabilización de CI es independiente de la acción de HIF-1 α (Figura I.10D).

El hecho de que cambios en los niveles de CoQH₂ y la activación de la vía HIF-1 α no estuvieran relacionados con la estabilización de CI en hipoxia, unido al hecho de que la sobreexpresión de SOD2 es también capaz de estabilizar CI, sugiere que el mecanismo que media la restauración de CI en hipoxia es la falta de producción de ROS.

Para confirmar la implicación de RET en el proceso, se realizó un nuevo experimento de cultivo de células Cox10^{KO} en hipoxia 48 horas para estabilizar CI, seguido de diferentes tiempos de reoxigenación. La degradación de CI inducida por reoxigenación fue prevenida por la preincubación con rotenona 2 horas antes del cambio de atmósfera (Figura I.11). Estos resultados sugieren que la degradación de CI ensamblado tras cultivo en hipoxia de células Cox10^{KO} se encuentra relacionada con la producción de ROS vía RET.

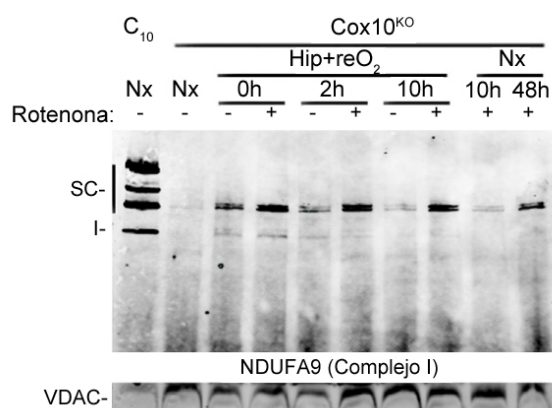


Figura I.11: La degradación, por reoxigenación, de CI estabilizado en hipoxia, es mediada por la interacción entre CoQH₂ y CI. BN-PAGE y western blot de mitocondrias solubilizadas con digitonina de células Cox10^{KO} y células control (C₁₀) cultivadas 48 horas en normoxia (Nx) o en hipoxia con diferentes periodos de reoxigenación (Hip+reO₂) indicados en horas (0h, 2h, 10h) y en ausencia o presencia de rotenona. El grado de estabilización de CI es testado con anticuerpo anti NDUF9. VDAC como control de carga. Líneas 9 y 10 muestran el grado de estabilización de CI debido exclusivamente al tratamiento en diferentes tiempos con rotenona, en normoxia.

I.2.4. Caracterización del proceso de degradación de CI en células carentes de CIV a nivel proteico.

Dado que la producción de ROS se encuentra implicada en la desestabilización de CI, nos propusimos evaluar si el CI sufre daño oxidativo previo a su desaparición en células mutantes. Para ello, se utilizó el modelo de hipoxia-reoxigenación en células Cox10^{KO}, de forma que se pudo estudiar el estado de oxidación del CI, estable en hipoxia o en diferentes

niveles de degradación según se incrementaba el tiempo de reoxigenación (**Figura I.12A**). La cantidad de proteínas totales de CI (ensambladas o no) se vio incrementada inicialmente tras reoxigenación y fue decreciendo hasta llegar a los niveles existentes en hipoxia, transcurridas 12 horas (**Figura I.12B**).

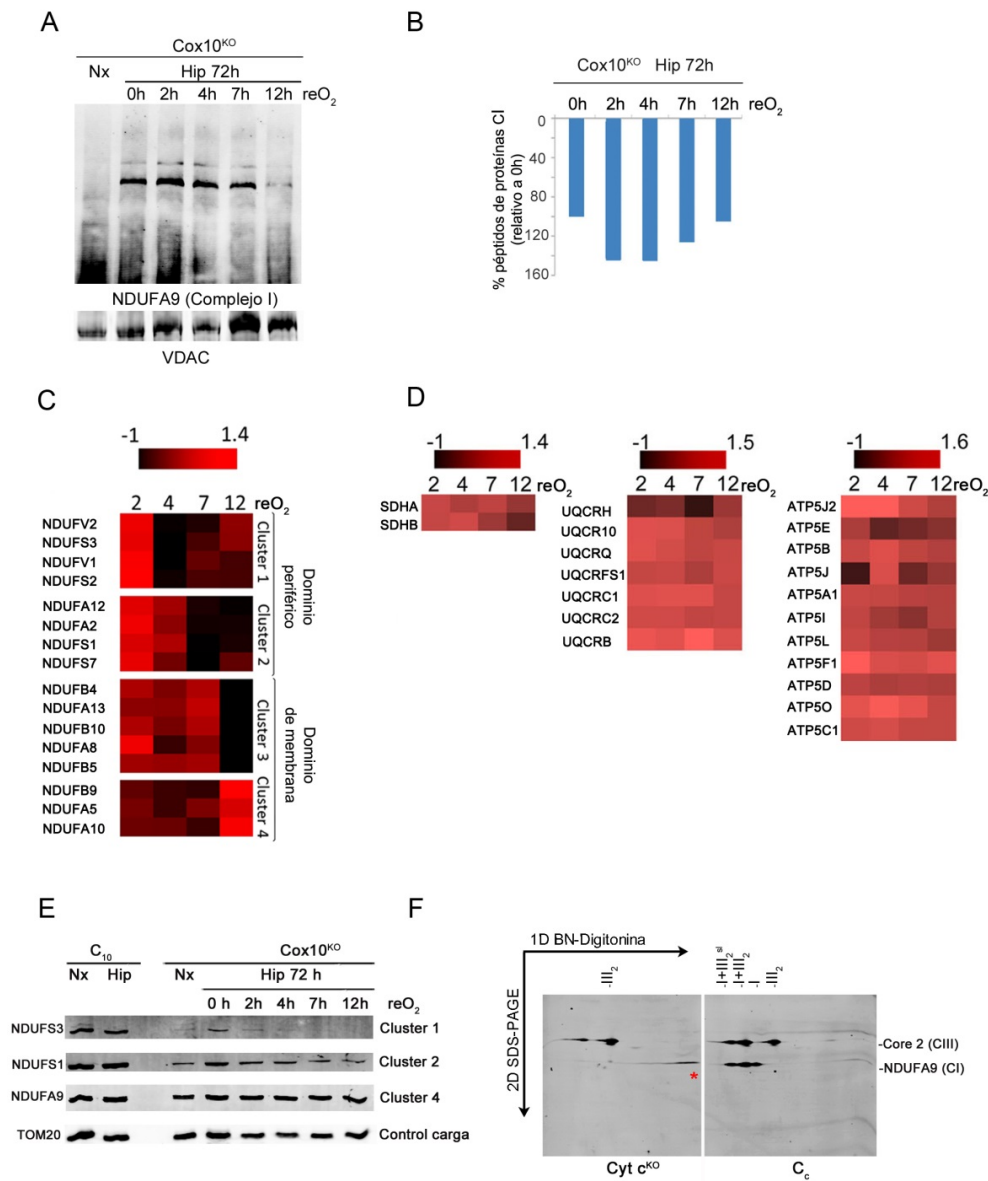


Figura I.12: Análisis de la estabilidad de complejos respiratorios y subunidades componentes de CI en modelo de estudio de hipoxia-reoxigenación en células Cox10^{KO}. **A)** Grado de estabilidad de CI a diferentes tiempos de reoxigenación y tras 72 horas en hipoxia en células Cox10^{KO}, revelado por BN-PAGE y western blot anti NDUF9 de mitocondrias solubilizadas con digitonina. VDAC como control de carga. **B)** Cuantificación de proteínas de CI totales (ensambladas y no ensambladas) calculada a partir del número de péptidos derivados de CI identificados en cada punto de reoxigenación por espectrometría de masas (porcentaje en relación a punto "reO₂ 0 horas" considerado 100%). **C-D)** Heatmap mostrando el comportamiento en la degradación de proteínas de CI (C) y cantidad de subunidades de CII, CIII y CV (D), en cada punto de reoxigenación post-hipoxia. La intensidad del color representa la concentración de la proteína en cada punto en relación a la concentración en hipoxia (0h), en unidades log₂ ratio, determinado por análisis proteómico cuantitativo (marcaje isotópico con ¹⁶O/¹⁸O). **C)** Cuatro grupos de proteínas, clasificados de acuerdo a su estabilidad, fueron obtenidos por análisis cluster jerárquico (Genesis v 1.7.6., Institute of Molecular Biotechnology, Graz University of Technology). Las proteínas contenidas en un mismo grupo se encuentran cercanas en el CI, especialmente en el caso del cluster 1 cuyos componentes muestran interacción física. Las proteínas menos estables son las del dominio periférico y las más estables las del dominio de membrana. **E)** Validación, por western blot, de la diferente estabilidad de subunidades de CI, según cluster al que pertenecen, detectada por marcaje isotópico en C). **F)** Inmunodetección de CI y CIII en segunda dimensión SDS-PAGE tras BN-PAGE, con mitocondrias solubilizadas con digitonina, de células sin CIV (Cyt c^{KO}) y células control (C_c). El asterisco rojo indica un subcomplejo de CI en células Cyt c^{KO}.

Para caracterizar el curso temporal de la degradación de proteínas de CI, se realizó un análisis proteómico cuantitativo por marcaje isotópico con ^{18}O estable y espectrometría de masas, en colaboración con la unidad de proteómica del CNIC. De este modo se pudo cuantificar la cantidad de cada proteína a diferentes tiempos de reoxigenación. El análisis de cluster jerárquico de las proteínas de CI, en función de su cantidad en cada punto del experimento, reveló que éstas pueden ser agrupadas en al menos cuatro comportamientos en relación al modo en que son degradadas (**Figura I.12C**), hecho que fue validado por western blot (**Figura I.12E**). El grupo de proteínas menos estables contiene subunidades de los módulos deshidrogenasas e hidrogenasa, NDUFV1, NDUFV2, NDUFS2 y NDUFS3. Un segundo cluster, con un perfil de degradación ligeramente retrasado en el tiempo, incluye a NDUFS1 y NDUFS7, del módulo hidrogenasa, y a NDUF A2 y NDUF A12, subunidades accesorias del brazo periférico. Los clusters 3 y 4 contienen proteínas estables (entre ellas NDUF A9), las cuales se encuentran localizadas en el brazo de membrana de CI (**Figura I.12C**). La cuantificación de subunidades de CII, CIII y CV (CIV está ausente) mostró gran estabilidad de todas ellas durante la reoxigenación, lo cual es coherente con ausencia de degradación (**Figura I.12D**). Estos resultados sugieren que la reoxigenación produce degradación local de proteínas dentro de CI, particularmente en los módulos deshidrogenasa e hidrogenasa. De hecho, proteínas más estables del cluster 4, como NDUF A9, pueden ser detectadas en subcomplejos en células sin CIV (**Figura I.12F**).

I.2.5. Evaluación de daño oxidativo a CI como fenómeno implicado en el mecanismo de degradación.

Para determinar la relación entre degradación de proteínas de CI y daño oxidativo, se realizó, sobre el mismo modelo de hipoxia-reoxigenación, un análisis proteómico con la técnica GELSILOX, en el grupo de proteómica del Dr. Jesús Vázquez en el CNIC. Esta aproximación permite el análisis de alteraciones en el estado redox de cisteínas (Martínez-Acedo et al 2012).

El análisis de proteína mitocondrial de células Cox10^{KO} en hipoxia y tras diferentes tiempos de reoxigenación, permitió detectar 1068 cisteínas de 784 proteínas, de las 1098 proteínas descritas como mitocondriales en MitoCarta (Pagliarini et al 2008). Después de 72 horas a 1% O₂, la proporción global de péptidos con cisteínas identificados en estado oxidado fue muy bajo, en torno al 16%. Al cambiar el cultivo a atmósfera con 21% de O₂, se produjo un incremento cuyo máximo fue alcanzado tras 4 horas de reoxigenación, con el 22% de cisteínas oxidadas. Ese porcentaje descendió de nuevo con normoxia prolongada (**Figura I.13A**). Este efecto fue particularmente pronunciado en las proteínas de CI, cuya proporción de cisteínas oxidadas se incrementó desde el 32% en hipoxia hasta el 50% tras 4 horas al 21% de O₂. Por el contrario, el CII no mostró un incremento pronunciado, sino que se comportó como lo hacía el total de cisteínas mitocondriales detectadas. En el caso de CIII, fue observado un incremento en el porcentaje de cisteínas oxidadas, con un pico máximo a 4 horas de reoxigenación (**Figura I.13A**). Este dato es interesante dado que gran parte del CIII se encuentra asociado a CI. Sin embargo, las subunidades de CIII no mostraron signos de degradación (**Figura I.12D**).

En cuanto a las cisteínas concretas que pudieron ser monitorizadas a lo largo del periodo de reoxigenación, se observan dos comportamientos. Por un lado, se encuentran aquellas que no muestran cambios (**Figura I.13C**) y por otro las que resultan sensibles de una u otra manera al incremento en el porcentaje de oxígeno (**Figura I.13D**). Las primeras corresponden con cisteínas contenidas en las proteínas del brazo de membrana, NDUFS5, NDUF A8 y NDUFS7, detectadas sólo en forma oxidada. Esto resulta coherente con su participación en la formación de puentes disulfuro (Szkarczyk et al 2011) (**Figura I.13C**).

NDUFV1 y NDUF51 son subunidades del módulo NADH deshidrogenasa, y NDUF52 subunidad del módulo hidrogenasa, todas ellas en el brazo hidrofílico de CI (Figura I.13E).

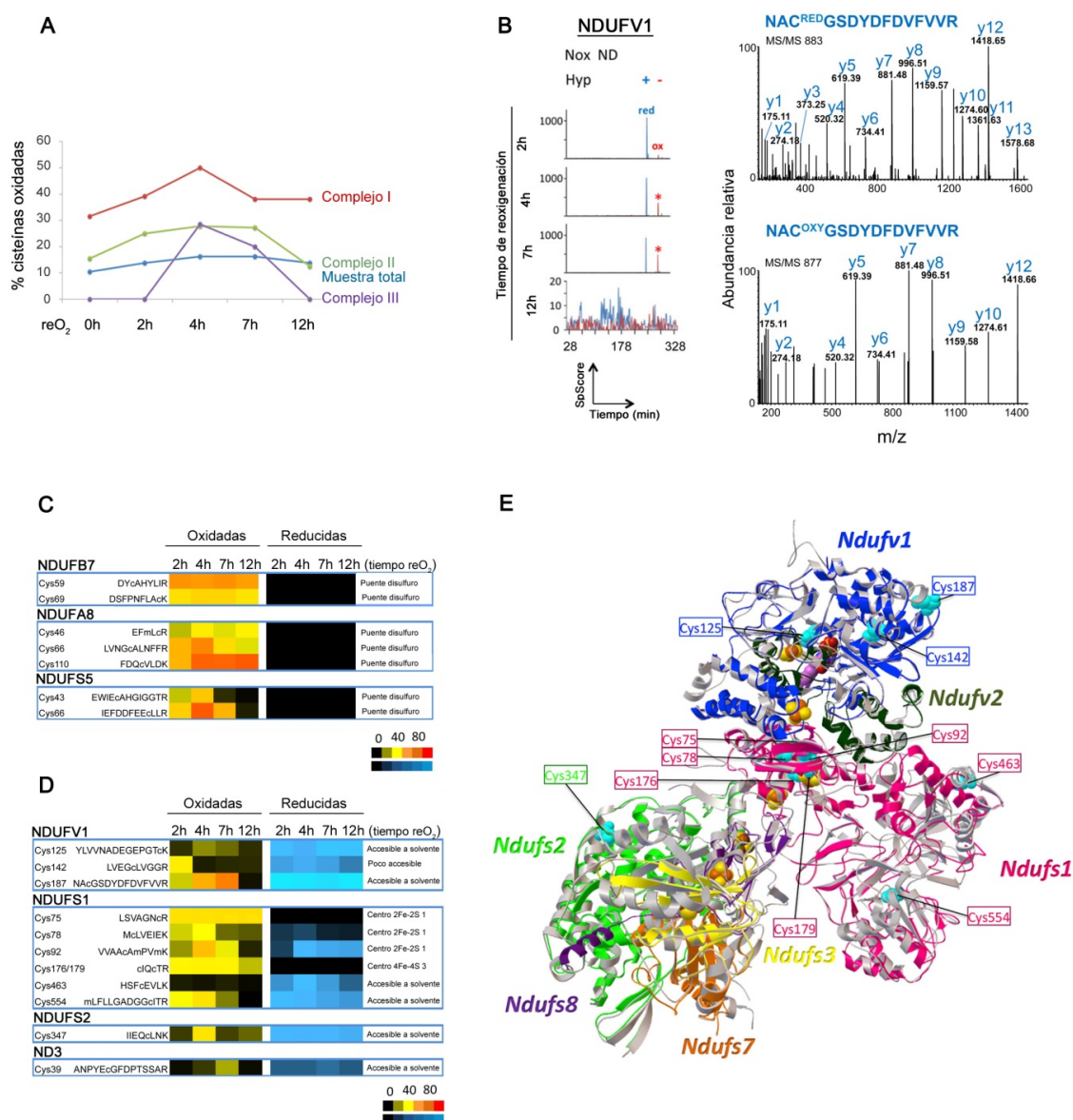


Figura I.13. Análisis, por espectrometría de masas, de alteraciones oxidativas en cisteínas durante el proceso de degradación de CI en células carentes de CIV. A, C, D) Análisis de estado redox de cisteínas a diferentes tiempos de reoxigenación tras 72 horas de hipoxia en mitocondrias de células *Cox10^{KO}*. **A)** Proporciones relativas de péptidos con cisteínas contenidas en estado oxidado *versus* reducido, identificados en muestra total de mitocondria o en los complejos indicados (CI, CII, CIII y CIV) por la técnica GELSILOX. **B)** A la izquierda, ejemplo representativo de monitorización de SpScores durante cromatografía del péptido con cisteína NACGSDYDFDVFFVR de NDUFV1, tras tratamiento para análisis GELSILOX. A la derecha, ejemplo representativo de espectro de fragmentación HCD de las especies reducida y oxidada. **C y D)** Análisis semicuantitativo de los niveles relativos de péptidos con cisteína oxidada o reducida de proteínas mitocondriales, detectados por data-independent DIS-MS, y estimados por SpScore (utilizado por SEQUEST para jerarquizar péptidos candidatos), de acuerdo a la escala de color indicada. **E)** Localización de las subunidades y cisteínas detectadas (cian) en un modelo de estructura de CI; el cofactor FMN se muestra en morado, los centros Fe-S en amarillo/rojo. Modelo realizado a partir de la superposición manual de las proteínas de ratón sobre la estructura del supercomplejo mitocondrial bovino (PDB:2YBB), con la herramienta *Python Molecular Viewer*. Dichas proteínas fueron previamente modeladas con la herramienta *SWISS-MODEL*, sobre la estructura de cada proteína homóloga de *Thermus thermophilus* determinada experimentalmente (modelo realizado por Fernando García Marqués, unidad de proteómica del CNIC). **A-D)** Análisis realizado en colaboración con el grupo de proteómica del CNIC.

Aunque la estructura de CI en ratón no ha sido resuelta, sí lo ha sido la de CI de ovino. En dicha estructura la proteína NDUFV1 contiene la flavina y un centro sulfoférico para el transporte de electrones, mientras que NDUF1 contiene 3 centros sulfoféricos y NDUF2 ninguno (Fiedorczuk et al 2016). Análisis de homología con proteínas homólogas en *Thermus thermophilus* y ovino (Baradaran et al 2013, Fiedorczuk et al 2016) han permitido al menos deducir los residuos implicados en la formación de centros sulfoféricos en ratón. Cabe destacar que, entre las cisteínas estudiadas, sólo se encuentran conservadas en *Thermus thermophilus* las cisteínas de NDUF1 Cys75, Cys78, Cys 92, Cys 176 y Cys 179. Tan solo la cisteína de NDUF1 Cys 463 no se encuentra conservada en CI de ovino.

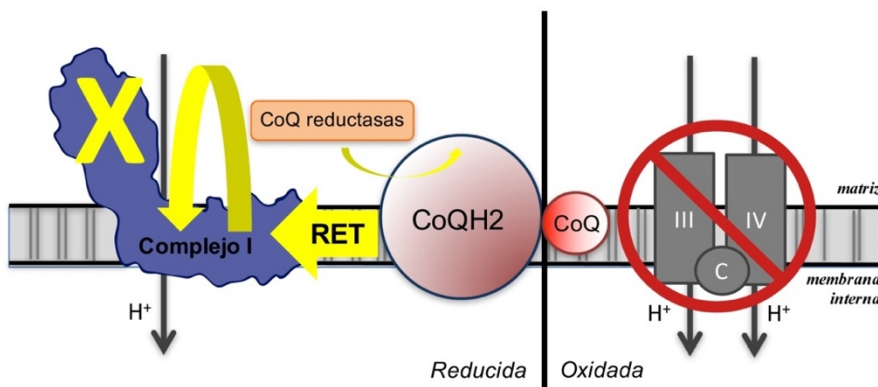
En estas tres proteínas, NDUFV1, NDUF1 y NDUF2, el perfil de cisteínas oxidadas y reducidas cambia tras reoxigenación, aunque el comportamiento es diferente según el residuo.

Ninguna de las tres cisteínas detectadas en NDUFV1 forman parte de centros sulfoféricos y todas ellas están en su inicio en ambos estados, oxidado y reducido. Dos de ellas, Cys125 y Cys 187, son accesibles a solvente y una tercera, Cys 142 es poco accesible (**Figura I.13D y E**). En todos los casos, la forma oxidada fue más sensible a reoxigenación, alcanzando un máximo a 2 horas en el caso de la Cys 142, a 4 horas en el caso de Cys125 y a 7 horas en Cys 187(**Figura I.13B y D**). Todas las formas oxidadas desaparecieron tras alcanzar su máximo de oxidación, sugiriendo que las formas oxidadas son inestables tras reoxigenación, siendo la más inaccesible a solvente, más incluida en el interior del complejo, la más sensible a este fenómeno (**Figura I.13D**).

En NDUF1, las cisteínas Cys75, Cys176 y Cys 179 fueron detectadas tan solo en su estado oxidado, lo cual es coherente con su participación en la formación de centros sulfoféricos. Las Cys 78 y Cys 92 mostraron una marcada sensibilidad a reoxigenación, siendo las formas oxidadas rápida y progresivamente reemplazadas por sus formas reducidas. Ésto sugiere un progresivo daño en los centros sulfoféricos por oxidación. Las Cys 463 y Cys 554 fueron detectadas principalmente en forma reducida y el máximo incremento en las formas oxidadas se produjo a las 4 horas. El mismo comportamiento presentó la Cys 347 de NDUF2, también accesible a solvente (**Figura I.13D**).

La cisteína detectada en ND3, Cys 39 está implicada en la transición entre la forma activada y desactivada de CI en respuesta a daño por isquemia/reperfusión, encontrándose ésta muy expuesta tras hipoxia (Galkin et al 2008, 2009). En nuestro análisis, esta cisteína mostró un máximo de oxidación a las 7 horas, mismo punto en que CI comienza a ser eliminado.

La oxidación de cisteínas específicas y la diferente estabilidad y degradación de subunidades de CI sugieren que la reoxigenación produce oxidación transitoria de cisteínas críticas, entre ellas, las localizadas en centros Fe-S en los módulos hidrogenasa y NADH deshidrogenasa. La desestabilización de estos centros y de otras cisteínas, probablemente sea el disparador que induce a la degradación de las subunidades contenidas en estos módulos, desencadenando la degradación de CI.



I.3. Reproducibilidad del mecanismo responsable de la degradación de CI en contextos fisiológicos.

Una vez dilucidado el mecanismo responsable de la falta de CI en nuestros modelos celulares, y volviendo al objetivo original de este trabajo, decidimos investigar si ese mismo mecanismo podría explicar la caída de CI previamente descrita en animales en ayuno. Esta disminución de CI y el desensamblaje de SCs que lo contienen, es interpretada como una reestructuración de la cadena respiratoria para optimizar la entrada de electrones a partir de enzimas no unidas en SCs, como CII o ETF de la β -oxidación (ver apartado *Objetivos*).

I.3.1. Evaluación de la reproducibilidad de degradación de CI debida a bloqueo del flujo electrónico en células control.

La inhibición de la actividad de CIII y CIV en células *wild-type* no indujo una degradación completa de CI, pero redujo significativamente su cantidad, especialmente en su estado superensamblado (**Figura I.15A**). Estos resultados son coherentes con la observación previa de que la inhibición química de la actividad de CIII en células control, no es capaz de reproducir totalmente la desestabilización de CI en células *Cytb^{KO}* (Acín-Pérez et al 2004).

Una primera aproximación para estudiar si este fenómeno guarda relación con el mecanismo propuesto, es el tratamiento de las células con rotenona, previo a la inhibición de CIII o CIV. Dicho pretratamiento previno la degradación de CI, lo que confirma la implicación de la interacción CoQ-CI, también en el fenómeno observado en células control (**Figura I.15B**).

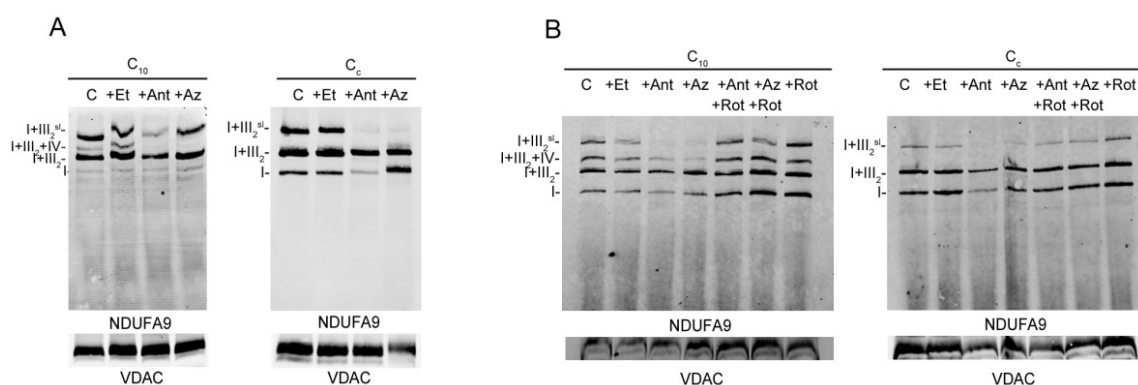


Figura I.15. El bloqueo del flujo de electrones por inhibición química de CIII y CIV produce degradación parcial de CI prevenible con rotenona, en células control A y B) Western blot sobre BN-PAGE de mitocondrias, tratadas con digitonina, de células C₁₀ y C_c (controles isogénicos de las células mutantes *Cox10^{KO}* y *Cyt^{KO}*, utilizadas en experimentos de la sección anterior). Los tratamientos indicados fueron realizados durante 48 horas, excepto en el caso de los tratamientos dobles en los cuales la rotenona fue preincubada 2 horas antes. C: control sin tratamiento. Et: etanol (vehículo), Ant: antimicina (inhibidor CIII), Az: azida (inhibidor CIV). La estabilidad de CI fue revelada con anticuerpo anti NDUFA9. VDAC como control de carga.

1.3.2. Evaluación de la reproducibilidad de la degradación de CI en respuesta a cambio de sustrato en líneas celulares.

A continuación, evaluamos si era posible reproducir en cultivo celular la disminución de CI observada *in vivo* en respuesta al cambio en las proporciones de NADH y FADH₂, derivada del cambio de sustrato. (Lapiente-Brun et al 2013). Para ello se aportó a las células control tres diferentes fuentes de carbono: galactosa, glucosa y ácidos grasos (AlbuMAX). El cambio de glucosa a galactosa no supone una variación en el aporte a la mETC a partir de piruvato, por lo que la relación NADH:FADH₂ no se ve alterada. En consecuencia, no se observaron cambios importantes en la cantidad de CI o su estado de superensamblaje al cultivar las células con galactosa en lugar de con glucosa (**Figura I.16 A y B**). Por el contrario, el cambio de glucosa por ácidos grasos, en el medio de cultivo, sí disminuye la relación NADH:FADH₂, lo que se manifestó como una reducción en contenido de CI, reproduciendo el efecto observado con la inhibición de CIII y CIV. Dado que las células C_c carecen de SCAF1 funcional, y por tanto no presentan interacción entre CIII y CIV, la banda de respirasoma es ausente (**Figura I.16 B**). En este tipo celular, el efecto de caída de CI fue más marcado en el CI libre y en la banda de CI+III₂^{sl} (**Figura I.16 B**). En la línea celular C₁₀, la cual sí posee SCAF1, y por tanto respirasoma, el efecto fue más evidente en CI+III₂+IV y en CI+III₂^{sl} (**Figura I.16 A**).

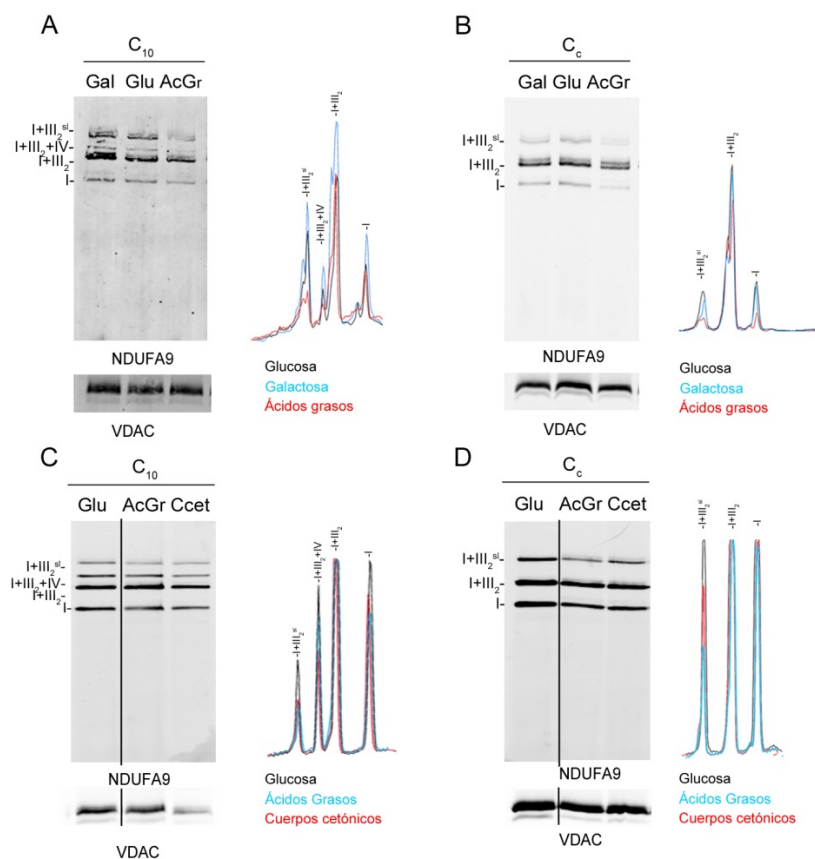


Figura I.16. El incremento en el aporte de electrones a la mETC vía FADH₂, disminuye la cantidad de CI, en células control. A-D) Izquierda: Western blot sobre BN-PAGE de mitocondrias, tratadas con digitonina, de células C₁₀ y C_c (controles isogénicos de las células mutantes Cox10^{KO} y CytC^{KO}, utilizadas en experimentos de la sección anterior) y cultivadas durante 24 horas en medio de cultivo libre de azúcares suplementado con el sustrato indicado. Glu: glucosa; Gal: galactosa; AcGs: ácido grasos (AlbuMAX); Ccet: cuerpos cetónicos (β-hidroxibutirato y acetoacetato). La cantidad de CI es testada con anticuerpo anti NDUF9. VDAC como control de carga. **A-D) Derecha:** Señales densitométricas de las bandas electroforéticas.

Para confirmar la correlación entre el cambio del ratio NADH:FADH_2 aportado por diferente sustrato y el ajuste de la cantidad de CI, se evaluó un nuevo cambio de sustrato, esta vez cultivando las células en presencia de cuerpos cetónicos (mezcla equimolar de β -hidroxibutirato y acetocetato). Este sustrato produce, teóricamente, un ratio NADH:FADH_2 de 3,5. No es tan bajo como el producido durante el consumo de ácidos grasos ($\text{NADH:FADH}_2=2$), pero sí significativamente menor al producido con glucosa ($\text{NADH:FADH}_2=5$). En ambos tipos celulares, el cultivo en cuerpos cetónicos produjo una reducción de CI similar a la producida por ácidos grasos (**Figura I.16 C y D**).

I.3.3. Evaluación de la implicación de la ratio CoQH_2/CoQ y producción de ROS vía RET en el fenómeno de degradación de CI en contextos fisiológicos.

Para evaluar si la degradación de CI en los modelos anteriores se debía al mecanismo propuesto, se analizaron la ratio CoQH_2/CoQ y la producción de ROS.

La inhibición de CIII y CIV aumentó significativamente la proporción de CoQ en estado reducido, efecto que fue bloqueado por rotenona. Por tanto, el efecto protector que la rotenona presenta frente a la degradación de CI podría ser debida tanto a la bajada parcial de la ratio CoQH_2 como, probablemente, al bloqueo de interacción entre el CoQH_2 , aún en exceso, y el CI (**Figura I.17A**).

La reducción de CI tras cambio de sustrato, de glucosa a ácidos grasos, correlacionó con una elevación en la proporción de CoQH_2 y una producción elevada de ROS. La elevación de ROS en células cultivadas con ácidos grasos, se revirtió con la preincubación con rotenona previa al ensayo de medición de ROS. Al mismo tiempo, la rotenona fue capaz de inducir producción de ROS en células cultivadas en medio con galactosa (**Figura I.17A-B**). Con estos datos se puede concluir que el cambio de glucosa a ácidos grasos incrementa la proporción de CoQH_2 , lo cual conlleva producción de ROS vía RET y degradación de CI.

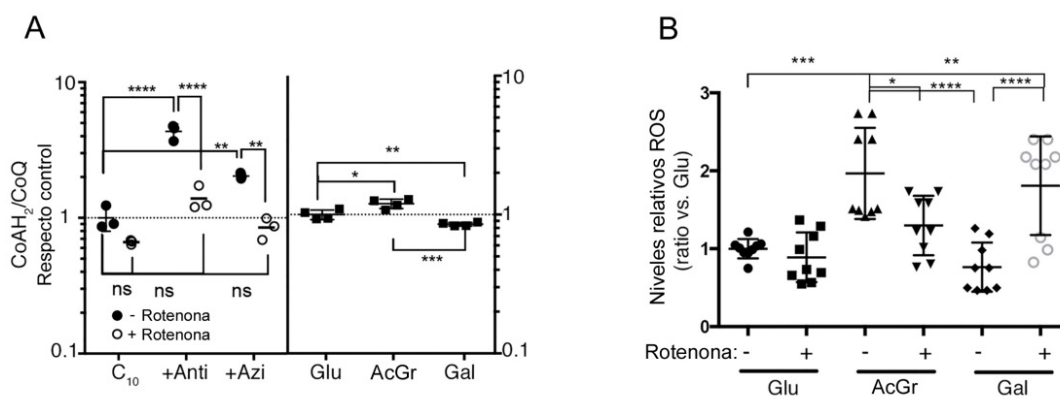


Figura I.17. La degradación de CI, en respuesta a inhibición de CIII/CIV y a cambio de sustrato con incremento de aporte de FADH_2 , es mediada por incremento de ratio CoQH_2 y de producción de ROS vía RET. A) Medida del ratio CoQH_2/CoQ en células C₁₀ (control isogénico de Cox10^{K0}) tras inhibición de CIII o CIV con el inhibidor indicado, en presencia o ausencia de rotenona, o tras cultivo por 24 horas en el sustrato indicado. Anti: antimicina; Azi: azida; Glu: glucosa; AcGr: ácidos grasos; Gal: galactosa. Datos son media \pm SD; (n= 3-4). B) Análisis de la producción de ROS por citometría de flujo en presencia o ausencia de rotenona tras 24 horas de cambio de sustrato. Datos son media \pm SD; (n= 9) A-B) Diferencias estadísticas evaluadas por ANOVA Tukey test; *p< 0.05, **p< 0.01, ***p< 0.001, ****p< 0.0001).

Para confirmar la relación entre RET y la remodelación de la mETC por degradación de CI, se realizó la activación de RET vía incremento de la actividad de CII. Para ello se hizo uso del mecanismo recientemente publicado, según el cual un incremento de H_2O_2 es capaz

de activar la tirosin kinasa Fgr que incrementa la actividad de CII por fosforilación (Acin-Perez et al 2014, Nath et al 2015). Células *wild-type* fueron incubadas con xantina y xantina oxidasa en el medio de cultivo. El H_2O_2 derivado de la oxidación de xantina se detectó fácilmente (**Figura I.18A, arriba**). La inhibición del CII con ácido nitropropiónico (NPA) en células con incremento de H_2O_2 , redujo significativamente la producción de ROS, lo que indica que la adición de H_2O_2 externo desencadena una segunda onda de producción de ROS dependiente de la actividad de CII (**Figura I.18A, arriba**). La activación de CII, vía incremento de H_2O_2 , produjo la reducción de la actividad de CI+III₂ (**Figura I.18A, abajo**) y de la cantidad de CI, revelada por BN-PAGE (**Figuras I-18B-C**). La pérdida de CI y actividad CI+III₂ inducida por H_2O_2 se evitó mediante la inhibición de CII con NPA (**Figura I.18A, abajo y Figuras I-18B-C**).

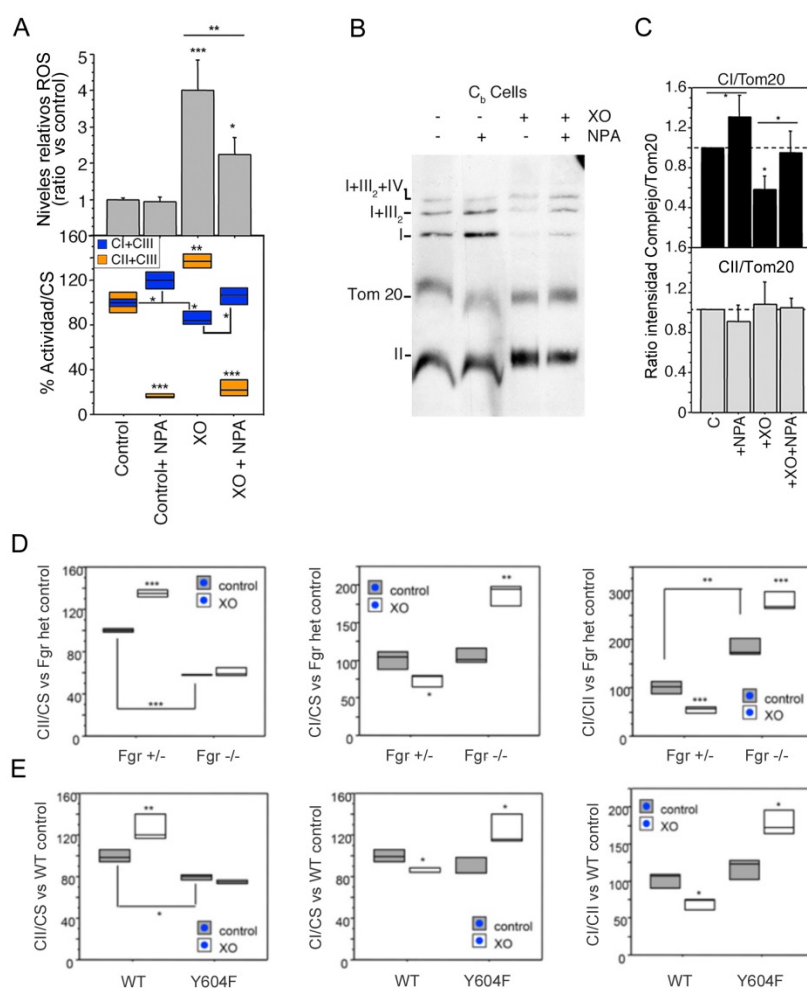


Figura I.18. El RET regula el balance fisiológico de CI/CII. A) Arriba: Análisis por citometría de flujo de producción de ROS en células control *C₆* tratadas 6 horas con xantina oxidasa (100 mU/ml) + xantina (XO) 100 mM, como fuente de H_2O_2 , y/o ácido nitropropiónico (NPA) 1 mM, como inhibidor de CII. Datos son media \pm SD; ($n \geq 4$) **A) Abajo:** Efecto de H_2O_2 en las actividades CI+III y CII+III en células control *C₆* tratadas con XO como fuente de H_2O_2 y/o NPA como inhibidor de CII. Datos normalizados por actividad de citrato sintasa (CS) ($n \geq 4$). **B)** BN-PAGE de mitocondrias solubilizadas con digitonina de células control *C₆* tratadas con XO y/o NPA. Cantidad de CI revelada con anticuerpo antiINDUFA9, CII con anti SDHA y Tom20 como control de carga. **C)** Cuantificación de los cambios en CI y CII, normalizados por la cantidad de Tom20, en B). **D-E)** Medida de actividades de CI y CII, normalizadas por actividad de CS, en células insensibles a la vía de activación de CII, por ausencia de la quinasa Fgr (Fgr^{-/-}) o por la mutación del residuo diana para fosforilación (Y604F). **A-E)** Diferencias estadísticas evaluadas por ANOVA Tukey test; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

En el mismo sentido, células que carecían de Fgr kinasa o con el residuo diana de esta kinasa mutado, poseían baja actividad de CII e insensibilidad a la activación por H_2O_2 exógeno. Del mismo modo, la actividad de CI no se veía reducida por la adición de xantina y xantina oxidasa, confirmando que dicha reducción requiere de la activación de CII (**Figura I.18D-E**). Estos experimentos establecen una relación causal entre RET y reducción de la cantidad de CI en células control cuando el aporte de electrones vía $FADH_2$ es incrementado.

Finalmente, para analizar si el mecanismo observado, primero en las células mutantes, y después en células control, se produce *in vivo*, se examinó el *Caenorhabditis elegans* mutante para el gen *gas-1*, el cual presenta desestabilización de CI por expresión anormalmente alta de CII (Pujol et al 2013). Los mutantes de *gas-1* fueron muy sensibles a bajas dosis de rotenona (**Figura I.19A**). El tratamiento durante 10 horas, con una concentración 7 μM de rotenona, estabilizó significativamente el CI (**Figura I.19B**).

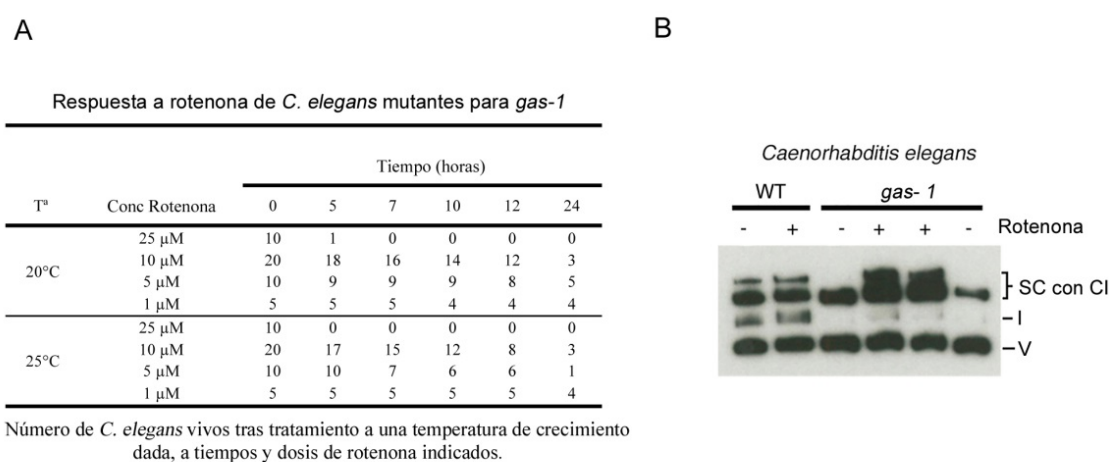


Figura I.19. El RET regula el balance fisiológico de CI/CII *in vivo*. **A)** Respuesta a rotenona de *C. elegans* mutantes para *gas-1*. Se muestra el número de animales vivos tras el tratamiento a diferentes temperaturas, tiempos y concentraciones de rotenona. **B)** Western blot sobre BN-PAGE de mitocondrias solubilizadas con digitonina de *C. elegans* *wild-type* y mutantes para *gas-1*, en presencia o ausencia de rotenona. La estabilización de CI en mutantes fue revelada con anticuerpo anti NDUFS3 humano (homólogo de NUO-2 en *C. elegans*). CV como control de carga. Experimento realizado por la Dra. Claire Pujol en el laboratorio de la Dra. Aleksandra Trifunovic (Instituto de enfermedades mitocondriales y envejecimiento. Facultad de Medicina. Universidad de Colonia, Alemania).

Estos datos sugieren que el mecanismo de degradación de CI vía RET se da no solo en los mutantes de CIII, Cit c y CIV, sino también en contexto fisiológicos en los que la entrada de electrones vía $FADH_2$ se ve incrementada, como en el caso del uso de ácidos grasos como sustrato o del incremento en actividad de CII. Este mecanismo podría explicar la reducción de CI en hígado de animales consumiendo ácidos grasos, en los que dicha reducción es interpretada como un fenómeno conducente a la optimización en la entrada de electrones a la mETC vía $FADH_2$ (Lapiente-Brun et al 2013).

I.4. Caracterización del efecto del difenileno iodonium (DPI) sobre la estabilidad de CI.

En el transcurso de los experimentos realizados con diferentes inhibidores de CI en células mutantes y control se observó un fenómeno inesperado. El tratamiento en células control con rotenona y piericidina A no produjo, como era de esperar, efectos sobre la estabilidad y organización de complejos respiratorios en células control; sin embargo, el tratamiento con DPI produjo la degradación total y específica de CI. (Ver apartado I.2.3. *Evaluación de la interacción entre CoQH₂ y CI, como fenómeno implicado en el mecanismo de degradación*). Este fenómeno no guarda, en principio, relación con la degradación de CI vía RET; pero nos propusimos caracterizar en más profundidad el mecanismo que lo produce, dadas las numerosas aplicaciones que podría tener un compuesto capaz de degradar CI de manera selectiva.

El difenileno iodonium (DPI) es un inhibidor de NAD(P)H oxidasas y otras flavoproteínas, muy utilizado como inhibidor de la producción de superóxido por NADPH oxidasa en neutrófilos y macrófagos y capaz de inhibir también la producción la actividad y producción de ROS por CI (Liu et al., 2002). Se estima que DPI se une de manera irreversible al grupo FMN (Majander et al 1994) mientras que otros inhibidores de CI como rotenona y piericidina A lo hacen al sitio de unión de la CoQ (Fato et al 2010).

En primer lugar, se evaluó el efecto de diferentes concentraciones y tiempos sobre la degradación y actividad de CI, en fibroblastos *wild type*, derivados de la línea establecida L929, y utilizados de rutina en nuestro laboratorio para este tipo de análisis. Para testar la degradación de CI se utilizaron concentraciones de DPI en un rango que iba, desde valores muchos menores a los utilizados en la literatura para cultivos celulares, hasta un máximo de 1000 nM, concentración utilizada en nuestros primeros experimentos y en que CI era degradado. Sin embargo, la degradación del CI, dependiente del tiempo, era evidente ya con la concentración más baja (**Figura I.20A**). El resto de complejos no sufrieron degradación, si bien a 48 horas y concentraciones máximas de 800-1000 nM, el CIII parecía disminuir (**Figura I.20B**). El posible efecto sobre CIII no fue estudiado dado que esas condiciones resultaban tóxicas para las células, como se deduce de su muerte en cultivo en glucosa (**Figura I.20C**). La aparición de subcomplejos de degradación de CI (I_{SUB}) y de CI+III₂ (I+III_{2SUB}) denotan que el CI es degradado previamente a su disociación de SCs por un mecanismo bien definido y reproducible (**Figura I.20A**). Nótese que el subcomplejo de CI libre comigra con CIII₂+IV, por lo que la señal no es apreciable tras el revelado de CIII y CIV en western blot (**Figura I.20B**).

El análisis de crecimiento de las células a diferentes concentraciones de DPI en glucosa *versus* galactosa permitió discriminar qué concentraciones de DPI eran capaces de inhibir la actividad de CI (muerte en galactosa) sin producir toxicidad por otros efectos (muerte en glucosa) (**Figura I.20C**). Se seleccionaron dos concentraciones que pudieran ser útiles en experimentos posteriores, para un análisis en mayor detalle. La concentración máxima que permitía el crecimiento celular, al nivel de células sin tratar, inhibiendo la actividad de CI, 30 nM, fue seleccionada para experimentos de rutina. La concentración máxima que permitía el crecimiento celular, inhibiendo la actividad de CI, 400nM, fue seleccionada para experimentos en los que fuera necesario una degradación rápida y total de CI (**Figura I.20C**).

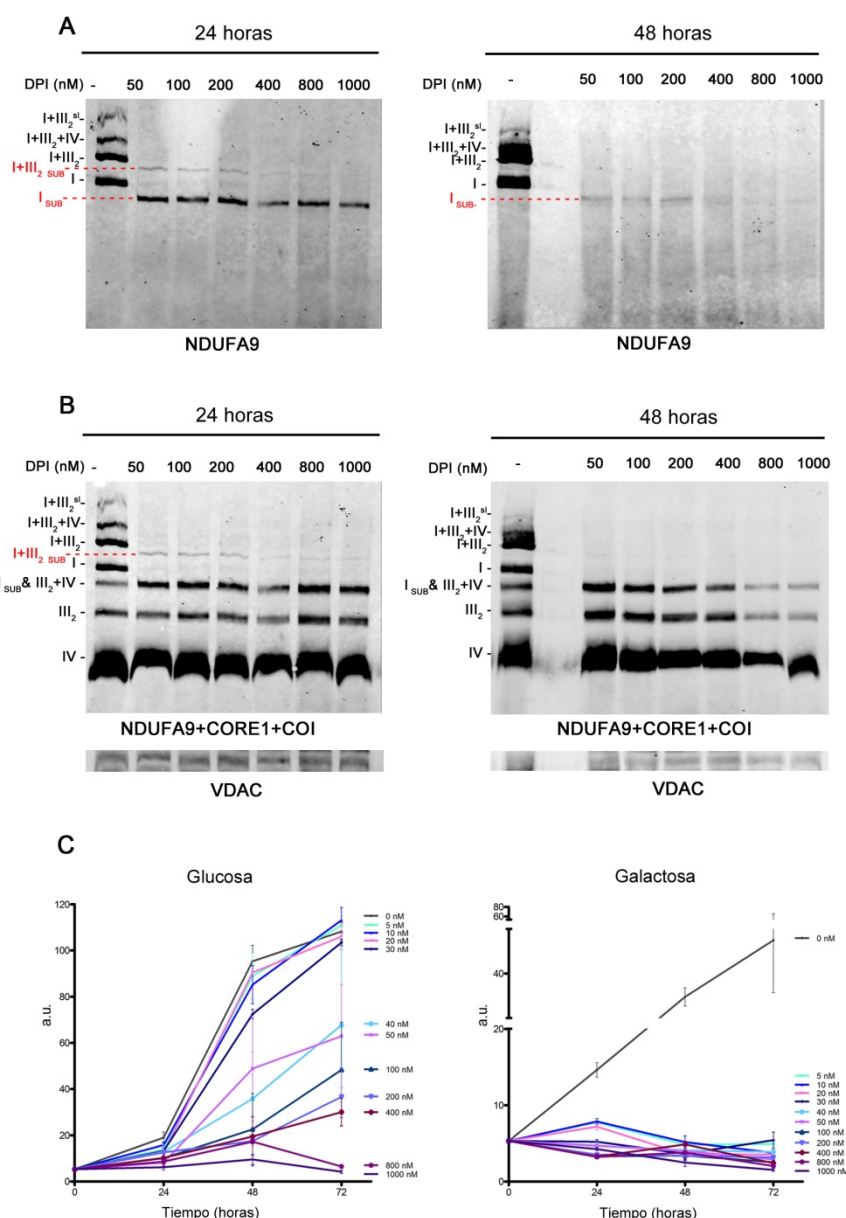


Figura 1.20. Caracterización del efecto, de diferentes dosis y tiempos de tratamiento con DPI, en la actividad y estabilidad de CI en fibroblastos wild-type. A-B) Western blot sobre BN-PAGE de mitocondrias solubilizadas con digitonina de células cultivadas con DPI los tiempos y concentraciones indicadas. **A)** Revelado de CI libre y asociado en SCs, íntegro (indicaciones en negro) o parcialmente degradado como subcomplejo (indicaciones en rojo) mediante anticuerpo antiNDUF9. **B)** Revelado de CIII (CORE1) y CIV (COI) sobre misma membrana revelada para NDUF9 en A). VDAC como control de carga. **C)** Medida de proliferación celular tras crecimiento con diferentes concentraciones de DPI. El crecimiento es testado en paralelo en células creciendo con glucosa o galactosa como sustrato. La mortalidad en glucosa indica toxicidad celular. La mortalidad en galactosa indica bloqueo de la cadena de transporte electrónico, en este caso por inhibición y/o degradación de CI. a.u.: unidades arbitrarias, proporcionales a la cantidad de DNA, medida por fluorimetría, y por tanto proporcional a la cantidad de células en cada punto.

Una vez seleccionadas las concentraciones de trabajo, se caracterizó la evolución temporal de la degradación de CI. La degradación se reveló por la aparición de subcomplejos de degradación, que sucedió a 2 horas de comenzar el tratamiento con una dosis de 30 nM, y a los 30 minutos con una dosis de 400nM. A las 24 horas, en ambos casos, la cantidad de CI era ya muy pequeña (**Figura I.21A–B derecha**). El seguimiento a tiempos cortos permite observar todos los subcomplejos de degradación formados a lo largo

de las 24 horas de experimento. Todas las formas de CI libre y superensamblado sufren el mismo proceso de degradación, sin liberación previa de sus asociaciones (estructuras de degradación indicadas en color rojo) (**Figura I.21A–B derecha**). Solamente el CI íntegro, libre o en asociación, presenta actividad NADH DH, revelada por ensayo de actividad en gel (**Figura I.21A–B izquierda**).

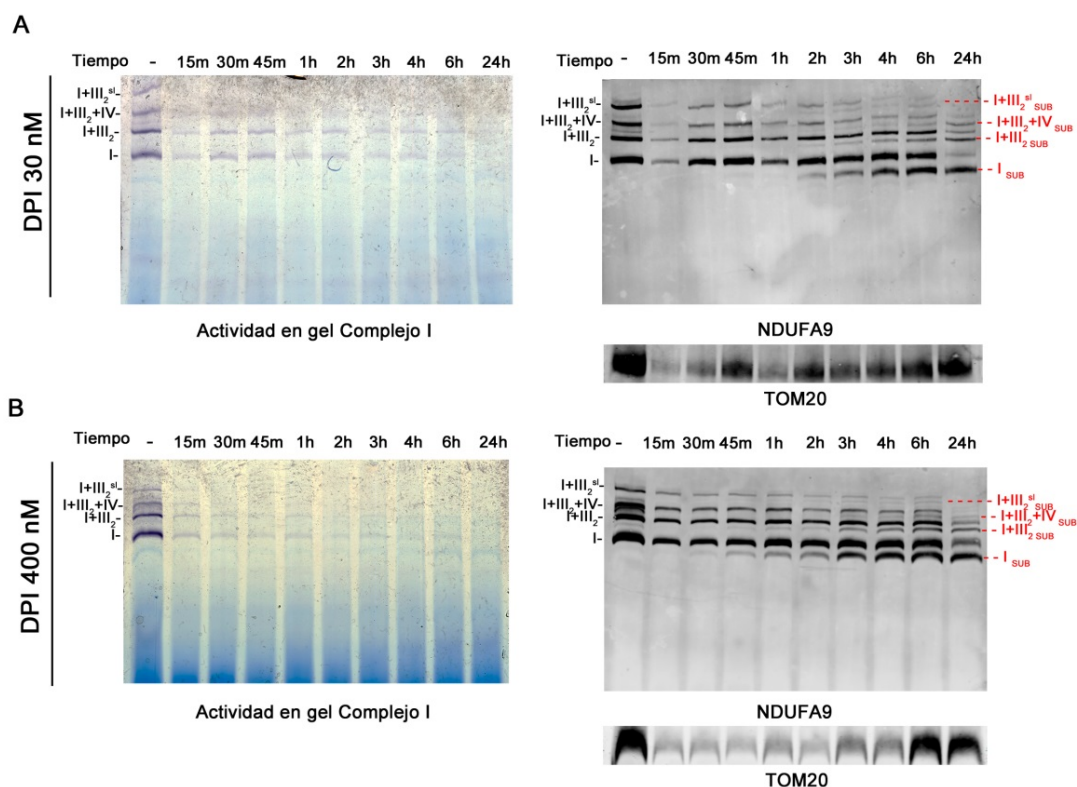


Figura I.21. Monitorización de la degradación de CI por tratamiento con concentraciones de DPI de 30nM o 400nM, a lo largo de 24 horas. **A)** Western blot sobre BN-PAGE de mitocondrias solubilizadas con digitonina de células cultivadas con DPI 30nM a diferentes tiempos. A la izquierda revelado por ensayo de actividad en gel de complejo I. Solo el CI íntegro presenta actividad. A la derecha revelado por western blot, con anticuerpo antiNDUF9, el cual permite observar tanto el CI íntegro y sus asociaciones (indicaciones en color negro) como el parcialmente degradado y sus asociaciones (indicaciones en color rojo). TOM20 como control de carga. **B)** Igual que en A) pero a una concentración de DPI de 400 nM. **A-B)** m: minutos; h: horas.

El subcomplejo de degradación formado a partir de CI presenta un peso molecular estimado de alrededor de 840 kDa, calculado en función de la similitud en migración con CI_{III_2+IV} en BN-PAGE. Sin embargo, dado que los complejos son resueltos por electroforesis nativa, su migración no depende exclusivamente del peso molecular, por lo cual no es posible definir éste con exactitud. El hecho de que los subcomplejos de degradación no presenten actividad NADH DH, sugiere la pérdida de componentes del módulo N, responsable de dicha actividad. El peso molecular teórico de CI en ausencia de módulo N es coherente con el peso molecular estimado de los subcomplejos observados. Teniendo en cuenta estos datos, se caracterizó la composición proteica del intermediario de degradación de CI, bajo la hipótesis de que se trata de un CI parcial con pérdida de módulo N.

Para ello se reveló una misma electroforesis nativa, resolviendo complejos y supercomplejos, con anticuerpos contra dos proteínas diferentes de CI. NDUFS1, una de las proteínas del módulo N, se utilizó para testar la presencia o ausencia de este módulo. El marcaje de NDUFA9, presente en complejos y supercomplejos como se observó en los experimentos anteriores, sirvió como control para visualizar el grado de degradación de CI y la presencia de subcomplejos. NDUFS1 sólo se encontró presente en complejo libre y supercomplejos con CI íntegro (**Figura I.22 A-C**). La degradación gradual de CI condujo a la liberación de CIII libre y asociado en III₂+IV, cuya cantidad se incrementó de manera proporcional a la pérdida de CI íntegro (**Figura I.22 D-F**). La cantidad de otros complejos respiratorios, incluido CII, no se vio afectada (**Figura I.22 A-F**).

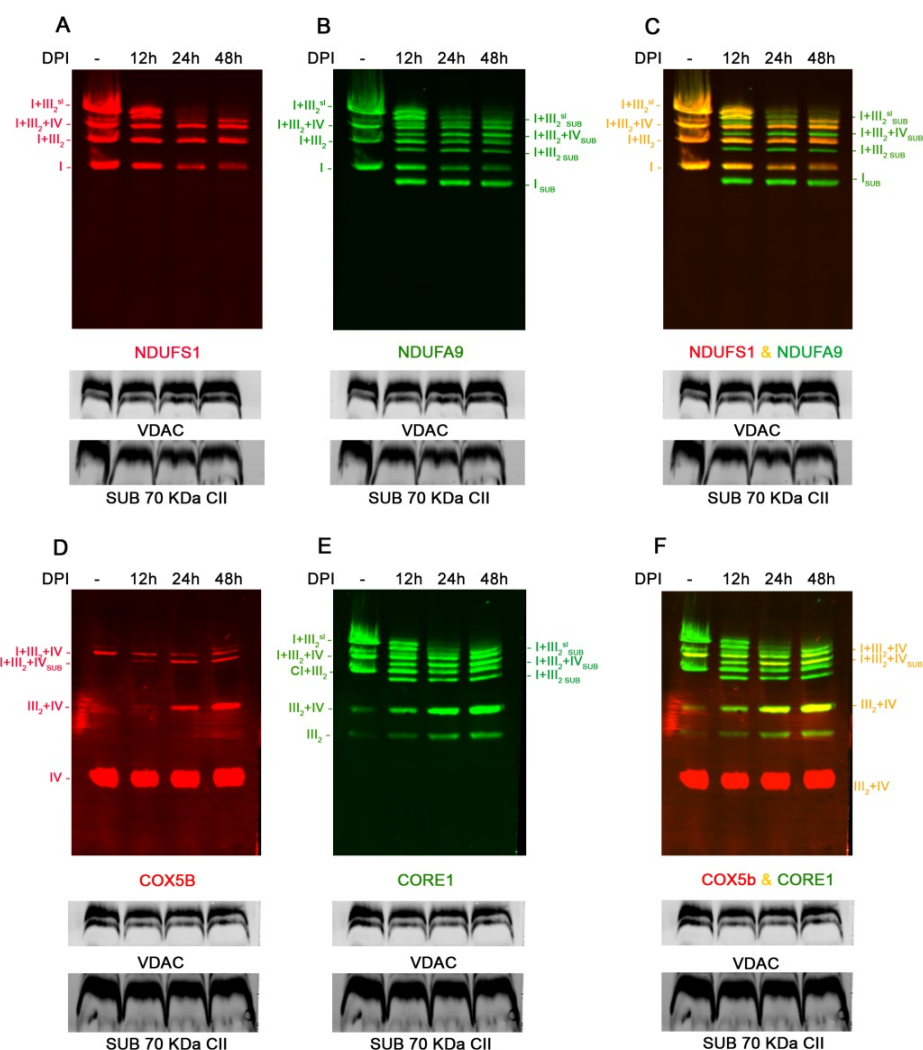


Figura I.22. Análisis de la presencia o ausencia de NDUFS1, componente del módulo N, en complejos y subcomplejos de degradación de CI. **A-F)** Western blot sobre BN-PAGE de mitocondrias solubilizadas con digitonina, de células cultivadas con DPI 30nM las horas indicadas. VDAC como control de carga. **A-C)** Los 3 paneles son revelados sobre misma membrana. Revelado con anticuerpos anti NDUFS1 (módulo N) y anti NDUFA9 (control de subunidad contenida en subcomplejos de degradación de CI). Colocalización de las subunidades en CI íntegro es indicado por color amarillo. **D-F)** Los 3 paneles son revelados sobre misma membrana. Revelado con anticuerpos anti COX5B (CIV) y CORE1 (CIII) muestra la liberación de CIII₂ y CIII₂+IV debida a la degradación de CI. Revelado con anticuerpo anti CII muestra ausencia de variación en la cantidad de éste.

Para profundizar más en la composición de los subcomplejos de degradación, una de las muestras anteriores fue resuelta en segunda dimensión SDS, para caracterizar qué proteínas se encontraban ausentes. Para ello se testó la presencia o ausencia de NDUFV1, NDUFV2 y NDUFS1, las proteínas de mayor peso molecular del módulo N y que forman su núcleo; NDUFS4, proteína accesoria de pequeño tamaño incluida en módulo N, NDUFV2 y NDUFS3, proteínas del módulo Q, en íntima interacción con el módulo N; NDUFV1 localizada entre módulo N y módulo Q; y NDUFS5, contenida en el brazo de membrana. Como se indica en la figura con asteriscos de color rojo, las proteínas ausentes en subcomplejos de degradación eran las constitutivas del módulo N. El resto de proteínas, incluidas las contenidas en la parte del módulo Q adyacente al N, se encontraban tanto en CI íntegro como en subcomplejos de degradación (**Figura I.23**).

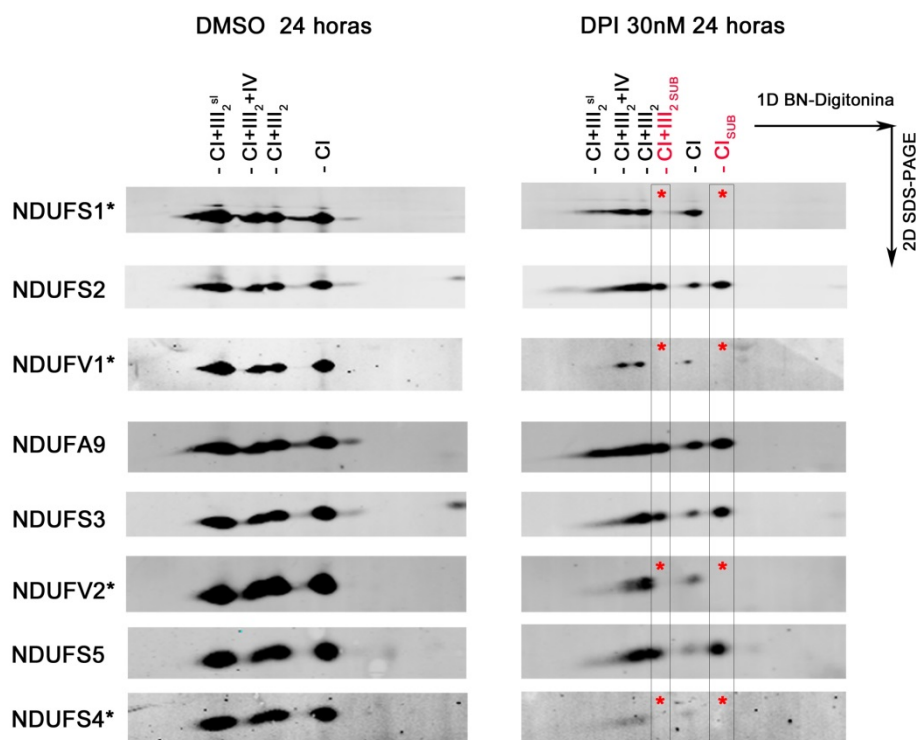


Figura I.23. Análisis de las proteínas ausentes en subcomplejos de degradación. Western blot sobre segunda dimensión SDS para la resolución de proteínas contenidas en SCs, complejos libres y subcomplejos de CI, a partir de BN-PAGE de muestra 24 horas realizado en Figura 1.22.

Un aspecto importante a evaluar, por su implicación en futuras aplicaciones, es la reversibilidad del fenómeno de degradación. La unión de DPI a FMN se considera irreversible (Majander et al 1994), por lo que decidimos evaluar la influencia de la retirada del compuesto tras tratamientos lo suficientemente prolongados como para degradar CI. Tras 48 horas de tratamiento con DPI, éste fue retirado. Las células presentaron CI íntegro libre y superensamblado, otras 48 horas después (**Figura I.24 B**). La integridad fue evaluada por la presencia de actividad NADH deshidrogenasa en gel (**Figura I.24 A**). El CI parcial residual presente en el punto cero fue estabilizado por su unión en SCs tras retirarse el DPI. El hecho de que SCs, formados con CI parcial, aparecieran previamente a la aparición de CI íntegro libre o superensamblado, parece sugerir que al menos parte de CI podría ser sintetizado reciclando el subcomplejo presente en tiempo cero (**Figura I.24**).

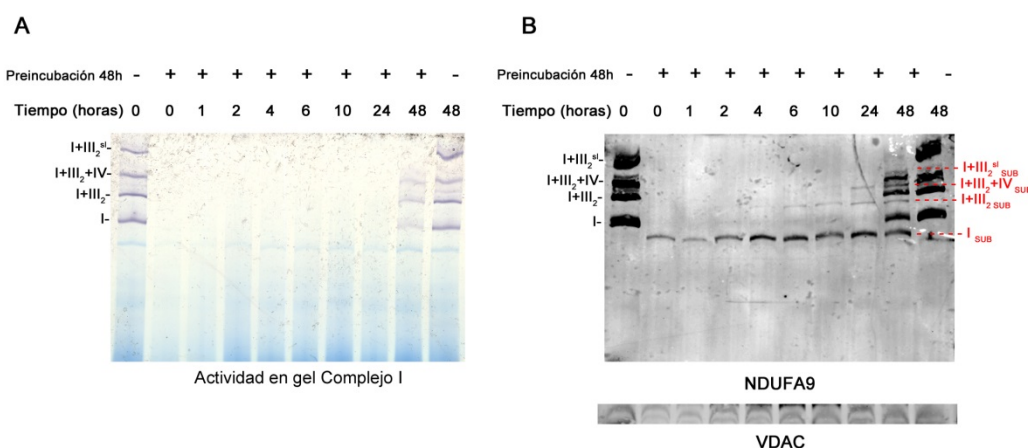


Figura 1.24. Evaluación de reensamblaje de CI tras retirada de DPI en mitocondrias con CI parcial residual. A-B) BN-PAGE de mitocondrias solubilizadas con digitonina de células preincubadas con DPI 30nM durante 48 horas y tras los tiempos indicados de cultivo en ausencia de DPI, durante los cuales CI es nuevamente ensamblado. **A)** Revelado de CI por ensayo de actividad en gel de CI. **B)** Revelado de CI por western blot con anticuerpo anti NDUFA9. VDAC como control de carga.

Dado que el subcomplejo de CI parece ser reciclado durante el ensamblaje de CI, se decidió hacer el mismo experimento partiendo de un punto cero con ausencia total de CI. De nuevo se apreció la formación de asociaciones de CI parcial en SCs, aparentemente previas a la aparición de SCs con CI íntegro (**Figura 1.25A**). Para obtener más detalle, se realizó electroforesis SDS en segunda dimensión a partir de BN-PAGE, pudiéndose apreciar la presencia simultánea de formas íntegras y parciales de CI (**Figura 1.25B**). Más experimentos serían necesarios para dilucidar si la presencia de subcomplejos, en las primeras horas post tratamiento, son debidas a un proceso fisiológico de asociación de CI parcial en SCs o al efecto del DPI residual sobre la síntesis de CI las primeras horas tras su retirada, como parece más probable. Independientemente de ello, se puede concluir que, tras la retirada de DPI, la célula es capaz de reensamblar CI funcional.

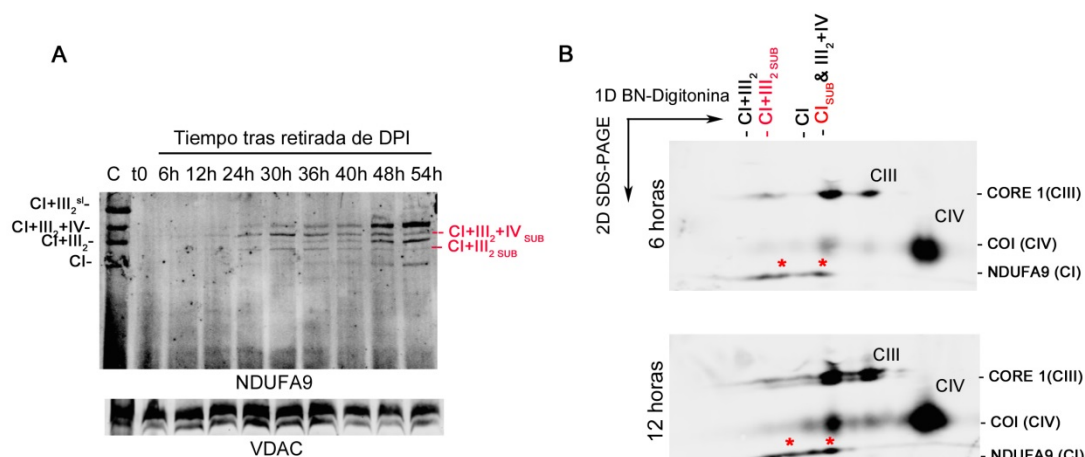


Figura 1.25. Evaluación de reensamblaje de CI, tras retirada de DPI, en mitocondrias con pérdida total de CI. **A)** Western blot sobre BN-PAGE de mitocondrias tratadas con digitonina, de células cultivadas con DPI 400 nM durante 48 horas. Seguimiento de reensamblaje de CI tras la retirada de DPI los tiempos indicados con anticuerpo antiNDUFA9. VDAC como control de carga. C: control sin tratamiento previo con DPI; t0: tiempo cero tras tratamiento con DPI sin cultivo posterior libre de DPI. **A)** Western blot sobre SDS-PAGE 2ª dimensión a partir de las muestras 6 h y 12 h mostradas en A). Los asteriscos rojos indican localización de formas libres o asociadas de CI parcial.

II. Búsqueda de factores implicados en la regulación estructural y funcional de los supercomplejos respiratorios

II. BÚSQUEDA DE FACTORES IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE LOS SUPERCOMPLEJOS RESPIRATORIOS.

La estrategia utilizada, para la búsqueda de proteínas implicadas en asociación a SCs, fue el análisis por espectrometría de masas de la composición proteica de geles BN-PAGE realizados a partir de tejidos y modelos celulares de ratón.

El análisis, llevado a cabo en colaboración con la unidad de proteómica del CNIC, se realizó mediante la técnica desarrollada en la unidad y denominada DIS (*Data Independent Scanning*), ya previamente aplicada en el estudio del estado de oxidación de cisteínas de esta misma tesis, en Figura I.13 (Guarás et al 2016). Dicha técnica de adquisición y procesamiento de datos es más sensible y reproducible que otras usadas hasta el momento para el estudio de la composición proteica de geles BN-PAGE (Heide et al 2012, Helbig et al 2009, Wessels et al 2009).

Se combinaron análisis a partir de preparaciones enriquecidas en mitocondria de diferentes fuentes, solubilizadas con digitonina y resueltas por BN-PAGE de la forma habitual. Tras la electroforesis, cada carril del gel fue recortado en 26 bandas, siendo la 1ª la de mayor peso molecular y la 26ª la de menor (si bien en este tipo de geles nativos, no sólo el tamaño, sino también la morfología de proteínas y complejos proteicos, influye en la posición de migración en gel). Cada una de estas bandas fue sometida a digestión triptica y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS). Tras el análisis y la identificación de péptidos, se generó una base de datos que contenía la información sobre el número de veces que cada péptido fue identificado en cada una de las 26 bandas del gel. De esta manera se pudo analizar la cantidad relativa de cada proteína en cada banda del gel y las posibles asociaciones entre ellas, basadas en las correlaciones de comigración en gel (el denominado complexoma mitocondrial).

NOTA: El análisis de espectrometría de masas fue realizado en colaboración con el grupo de proteómica del Dr. Jesús Vázquez del CNIC. El aspecto puramente proteómico y los datos extraídos forman parte por ello del manuscrito de la tesis doctoral de la estudiante de doctorado Marta Loureiro, del grupo del Dr Vázquez. Por tratarse de experimentos realizados en colaboración algunos de estos datos son reproducidos en el apartado II.1, centrándonos en su implicación biológica ya que son necesarios para el entendimiento de los resultados presentado en el apartado II.2.

II.1. Estudio del perfil de migración proteico en electroforesis en condiciones nativas, BN-PAGE.

Para este estudio se prepararon mitocondrias a partir de siete fuentes, tres tejidos y cuatro líneas celulares murinas, para las cuales se caracterizó la migración de proteínas en geles BN-PAGE.

Los modelos de tejido se seleccionaron teniendo en cuenta que éstos presentaran grandes diferencias metabólicas. Todos ellos fueron extraídos de ratones control de la línea CD1:

- Hígado.
- Corazón.
- Cerebro.

Las líneas celulares utilizadas fueron:

- FC57: considerado control por la ausencia de anomalías en función mitocondrial y presencia de todos los complejos respiratorios. (Moreno-Loshuertos et al 2006).
- ρ^0 929: línea celular sin mtDNA, que carece de los complejos respiratorios que contienen alguna subunidad codificada en el mtDNA (CI, CIII y CIV). En el caso de la ATPasa, se ha descrito la presencia de un complejo de menor peso molecular estabilizado, pero incompleto (Moreno-Loshuertos et al 2006).
- Línea celular ND4^{KO}, que carece de CI ensamblado (Perales-Clemente et al 2010).
- Línea celular Cox10^{KO}, que presenta deficiencia combinada de CIV y CI ensamblados (Diaz et al 2006).

El uso de células deficientes en componentes de la mETC, responde a tres motivos:

- Quisimos confirmar, por espectrometría de masas, un fenómeno que ha sido utilizado previamente como argumento en contra de quienes sugieren que la presencia de SCs en BN-PAGE es un artefacto derivado de solubilización y tratamiento con azul de *Coomassie*. El hecho de que la pérdida de un complejo respiratorio en la célula, haga cambiar el perfil de migración de otros complejos asociados a él en SCs, es indicativo de que la interacción es previa al tratamiento de muestras y electroforesis en gel (Acín-Pérez et al 2008).
- El perfil de migración de las células deficientes en complejos respiratorios permitirá discernir entre comigración en gel y asociación real. Dicho de otra manera, toda proteína candidata para interactuar con CI debe migrar en la misma posición que CI en un tejido o en células control. En el caso de una célula con deficiencias en mETC, el perfil de migración de CI cambiará, por falta de asociaciones o por la propia ausencia del complejo, y la proteína candidata deberá cambiar su perfil de migración en el mismo sentido que CI. De no ser así podemos concluir, que en tejidos control, la proteína comigra con CI sin interactuar con ella.
- La caracterización por sí misma del complexoma mitocondrial de estas células, podría aportarnos información acerca de cómo las deficiencias en la mETC pueden afectar a la presencia de otras proteínas o a la asociación de otros complejos no respiratorios.

A continuación, se muestra un ejemplo, de cómo la migración de las proteínas contenidas en complejos respiratorios, es coherente con el perfil de migración de cada uno de los complejos y SCs, siendo detectables la mayor parte de sus subunidades. El análisis mostrado es el realizado en células control FC57 (**Figura II.1**).

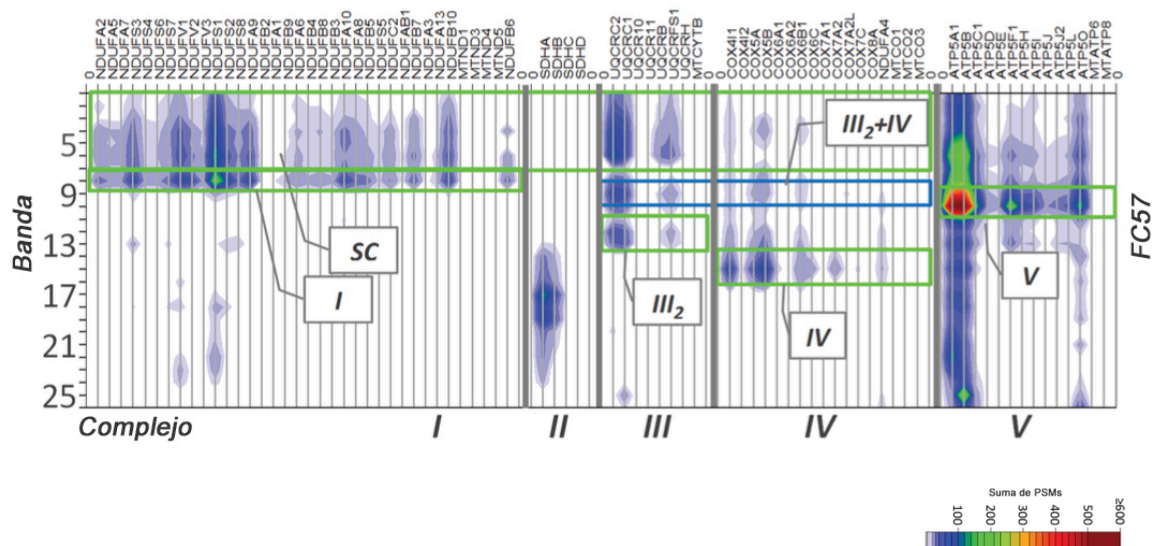


Figura II.1. Localización y abundancia de cada una de las proteínas de complejos respiratorios, en gel de BN-PAGE fragmentado en 26 bandas. El diagrama muestra las bandas (izquierda) en que cada proteína componente de la mETC (parte superior) ha sido detectada (CI, CII, CIII, CIV o CV). De esta manera es posible deducir en qué bandas se encuentran los complejos libres y los complejos comigrando en forma de SCs. La banda 1 corresponde con la zona del carril más cercana al pocillo de carga, mientras que la banda 26 corresponde con la parte más baja del gel. La intensidad de señal (ver diagrama de color en parte inferior) refleja la suma de PSMs (*peptide-spectrum-match*) de todos los péptidos identificados para cada proteína en cada banda. PSM es el número de veces que un péptido dado es identificado, y es utilizado como parámetro cuantitativo en este análisis.

Para la representación del perfil de migración de cada complejo respiratorio, se realizó la deconvolución de la señal de cada complejo respiratorio en sus componentes separados, es decir, en picos discretos representativos de componentes en que se presenta el complejo. Para ello se presume que cada componente podría ser descrito por distribución normal. Dicho análisis dio lugar a un perfil modelado de cada complejo, en que se aprecian cada uno de los complejos y SCs en igual posición para todos los tejidos (**Figura II.2A**). En relación a las líneas celulares control y deficientes en componentes de mETC, el perfil muestra que la pérdida de un complejo respiratorio supone el cambio en el perfil de migración de los complejos que interaccionan con él en SCs. Es el caso de las células carentes de CI, que pierden CIII y CIV a nivel de SCs, cuando CI desaparece a ese nivel, confirmando el hecho de que las interacciones entre estos complejos son reales y no sólo un evento de comigración en gel (**Figura II.2B**).

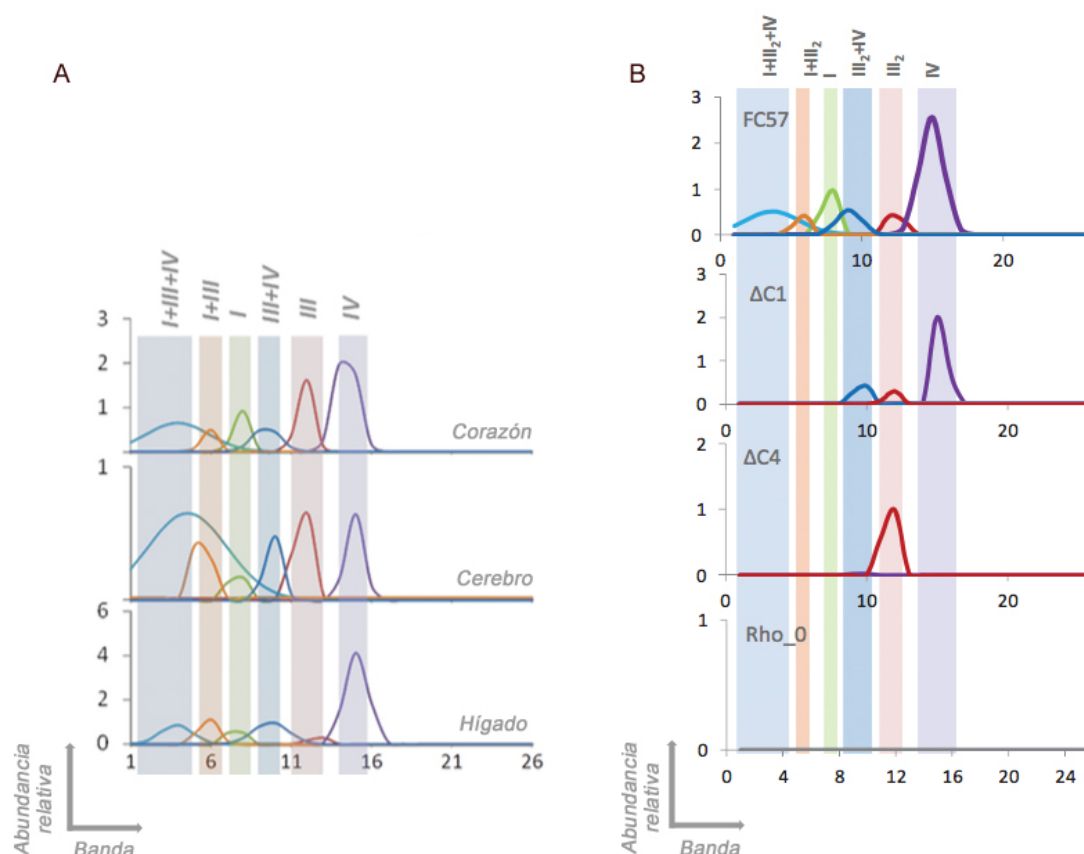


Figura II.2. Perfil de migración modelado de cada complejo respiratorio en todos los modelos a estudio. A) Perfil de migración de complejos y SCs en corazón, cerebro e hígado de ratones CD1. **B)** Perfil de migración de complejos y SCs en los modelos celulares a estudio: FC57 (células control), ND4^{KO} (ΔC1) Cox10^{KO} (ΔC4) y p⁰929 (rho 0). El eje X muestra el número de banda (la banda 1 corresponde con la zona del carril más cercana al pocillo de carga, mientras que la banda 26 corresponde con la parte más baja del gel). El eje Y muestra la abundancia relativa de cada complejo respiratorio.

El estudio implicó la realización de 450 carreras cromatográficas y 1350 horas de análisis computacional. Se identificaron 14.213 proteínas a partir de 58.780 péptidos únicos mapeados. Entre ellos se identificaron el 80% de las proteínas consideradas con localización mitocondrial (Tesis doctoral de Marta Loureiro, grupo del Dr. Jesús Vázquez). La información relativa a la migración electroforética permitió la generación de una matriz de correlación de todas las proteínas detectadas en el gel (**Figura II.3A**). Con este análisis se obtuvo un coeficiente de correlación entre el perfil de migración de cada proteína y el perfil de migración de cada complejo respiratorio en cada modelo de estudio. Un alto coeficiente de correlación entre una proteína dada y un determinado complejo respiratorio, en todos los tejidos y células, indica una alta probabilidad de interacción entre ellos. (**Figura II.3A**). El perfil de migración de la proteína candidata tiene además que cambiar, en el mismo sentido que lo haga el del complejo respiratorio, en las células mutantes. De este modo podemos descartar que el índice de correlación en tejidos y células control indique tan solo comigración no relacionada con interacción. Se obtuvieron 4 proteínas como potenciales candidatos de nuevos interactores con CI (**Figura II.3B**), siendo el mejor de ellos, la proteína EXTL1 (**Figura II.3C**). Observando el perfil de migración de CI (línea roja) para modelos de tejido y células control (FC57), puede constatar que la proteína EXTL1 (línea gris) se comporta de la misma manera que CI, especialmente a nivel de SCs, lo que justifica los altos coeficientes de correlación. En células mutantes para CI (ND4^{KO}), CIV (Cox10^{KO}) p⁰929, el CI no es ensamblado y los subcomplejos con CI parcial que se detectan no se localizan exactamente en el mismo lugar que EXTL1, si bien la cantidad de

esta proteína disminuye y cambia su perfil de migración a posiciones más bajas (**Figura II.3C**). Los experimentos llevados a cabo con el propósito de validar la potencial interacción entre la proteína EXTL1 y el CI, se muestran en el siguiente apartado (II.2).

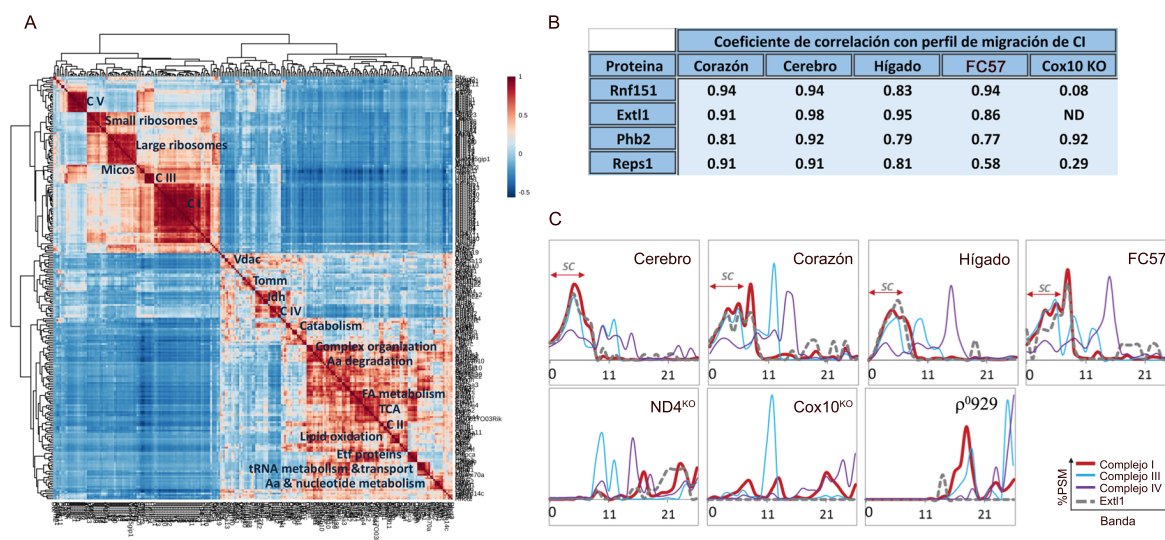


Figura II.3. Candidatos de interacción con CI obtenidos por estudio de correlación entre perfiles de migración en gel de CI y resto de proteínas detectadas en el gel. A) Matriz de correlaciones de migración en BNE entre diversas proteínas detectadas. **B)** Coeficiente de correlación entre perfil de migración da cada proteína candidata y perfil de CI en tejidos, células control (FC57) y células carentes de CIV y CI ensamblados (Cox10^{KO}). **C)** Perfil de migración de la proteína candidata EXTL1 sobre el perfil de los complejos respiratorios CI, CIII y CIV. El perfil de migración en gel de EXTL1, se superpone sobre el de CI, lo que permite visualizar su correlación, ya determinada por coeficiente de correlación en B).

II.2. Evaluación de la interacción de la proteína EXTL1 con complejos respiratorios.

La proteína EXTL1, candidata para la interacción con CI, pertenece a la familia de proteínas denominadas exostosinas, que contiene las proteínas EXT1, EXT2, EXT3, EXTL1, EXTL2 y EXTL3. Se han descrito mutaciones en los principales miembros de esta familia, EXT1 y EXT2, como responsables de un síndrome denominado exostosis múltiple, caracterizado por el crecimiento de osteocondromas (Busse-Wicher et al 2014). Se trata de glicoproteínas transmembrana implicadas en síntesis de heparán sulfato y localizadas en retículo endoplásmico (McCormick et al 2000) si bien ha sido descrito la acumulación de un heterodímero en aparato de Golgi (McCormick et al 2000). En cualquier caso, no existen evidencias de la presencia de EXTL1 en mitocondria. El resto de proteínas de la familia no han sido implicadas en el desarrollo de exostosis. Todas ellas conservan homología en la región C- terminal y en ciertas cisteínas, por lo que se les supone una estructura similar (Busse-Wicher et al 2014). Además, poseen dominios DXD, esenciales para la unión de UDP en proteínas glicosiltransferasas (Zak et al 2002).

El gen codificante para la proteína EXTL1 fue descubierto por homología de secuencia con otros componentes de dicha familia (Wise et al 1997). Se encuentra expresado en músculo esquelético, cerebro, corazón e hígado de ratón y minoritariamente en otros tejidos (Stickens et al 2000, C A Wise et al 1997). La actividad de EXTL1 no se conoce con claridad. La síntesis de cadenas de heparán sulfato supone cuatro actividades diferentes de tipo glicosil transferasa. Todas ellas fueron testadas *in vitro*, con una proteína de fusión A-EXTL1, sobre cadenas de heparán sulfato. EXTL1 tan sólo mostró actividad en el caso de la transferencia de grupos GlcNAc sobre grupos GlcA, sin embargo ésta resultó 10 veces menor a la de EXT1 (Kim et al 2001).

Dado que EXTL1 parece ser una proteína contenida en retículo endoplásmico y es conocida la interacción de membranas de este orgánulo con membrana externa mitocondrial, decidimos testar por western blot la existencia de dicha proteína en mitocondria. Para ello se utilizaron dos anticuerpos comerciales con diferente origen. El primero de ellos, generado en rata y monoclonal, el segundo generado en conejo y policlonal. En muestra de mitocondria de diferentes tejidos extraídos con el mismo grado de pureza que las muestras utilizadas para análisis proteómico, se vio que la banda de 72 kDa esperada para EXTL1 no era detectada, mientras que una banda en torno a 45 kDa era revelada por ambos anticuerpos (**Figura II.4A**). A pesar de que dicha banda podría considerarse inespecífica por no corresponder con el peso molecular esperado para la proteína de interés, el hecho de que dos anticuerpos de diferente origen arrojaran el mismo resultado, sugiere que dicha banda podría guardar relación con EXTL1.

Para confirmar que la banda revelada por los anticuerpos anti-EXTL1 provenía realmente en mitocondria, se realizó un ensayo con proteinasa K, capaz de degradar toda proteína no protegida por la membrana externa mitocondrial. La muestra de proteína celular total (Hom) y el sobrenadante obtenido tras centrifugación para obtención de mitocondrias (Cit), presentan la banda a nivel de EXTL1 (72kDa), y un doblete con una banda mayoritaria por encima del marcador de 48kDa y otra minoritaria por debajo. La segunda proteína del doblete, de entorno a 45kDa se encuentra muy enriquecida en mitocondria y protegida contra proteinasa K, por lo que ha de tratarse de una proteína mitocondrial. Este experimento nos indica que el anticuerpo anti-EXTL1 es capaz de detectar tres bandas, una de 72kDa (EXTL1) no presente en mitocondria, y otras de origen desconocido a 52kDa y a 45kDa. De estas dos últimas, tan solo la de menor peso molecular se encuentra en mitocondria, lo que nos permite hipotetizar que la proteína de 45kDa podría ser la misma que la de 52 kDa, previo procesamiento de la secuencia señal de importe a mitocondria (**Figura II.4B**).

Para dilucidar si el anticuerpo puede estar reconociendo una proteína de alguna manera derivada de la proteína EXTL1 o del gen *Extl1*, realizamos una inmunocaptura (IP) contra CI (los anticuerpos anti-EXTL1 no resultaron aptos para este tipo de ensayo). En la inmunocaptura sobre mitocondrias de hígado de ratón CD1, solubilizadas con digitonina, que presentan CI y SCs que contienen CI, el anticuerpo anti EXTL1 fue capaz de detectar la banda de 45kDa. En el caso de mitocondrias solubilizadas con DDM, en que se pierden las interacciones de CI con otros complejos, el anticuerpo anti-EXTL1 no detectó dicha banda en SDS-PAGE (**Figura II.4C**). Estos datos sugieren, que la proteína de 45kDa, detectada por el anticuerpo anti-EXTL1, se encuentra asociada a CI tan solo en supercomplejos. Con el mismo tipo de IP se realizó un ensayo por espectrometría de masas. La muestra obtenida tras IP de CI, fue resuelta por SDS-PAGE, paralelamente en western blot y tinción con azul de *Coomassie*. De este modo, a la altura en que el anticuerpo anti-EXTL1 era capaz de reconocer la banda de entorno a 45kDa en western blot, fue recortada la banda en el gel teñido con *Coomassie*. El análisis de dicha banda por espectrometría de masas fue capaz de detectar el mismo péptido con que EXTL1 fue caracterizada en el análisis original de los geles BN-PAGE (LIQEVAGSR). Dicho péptido es proteotípico, es decir, la única proteína conocida que lo contiene en su secuencia es EXTL1 (**Figura II.4D**).

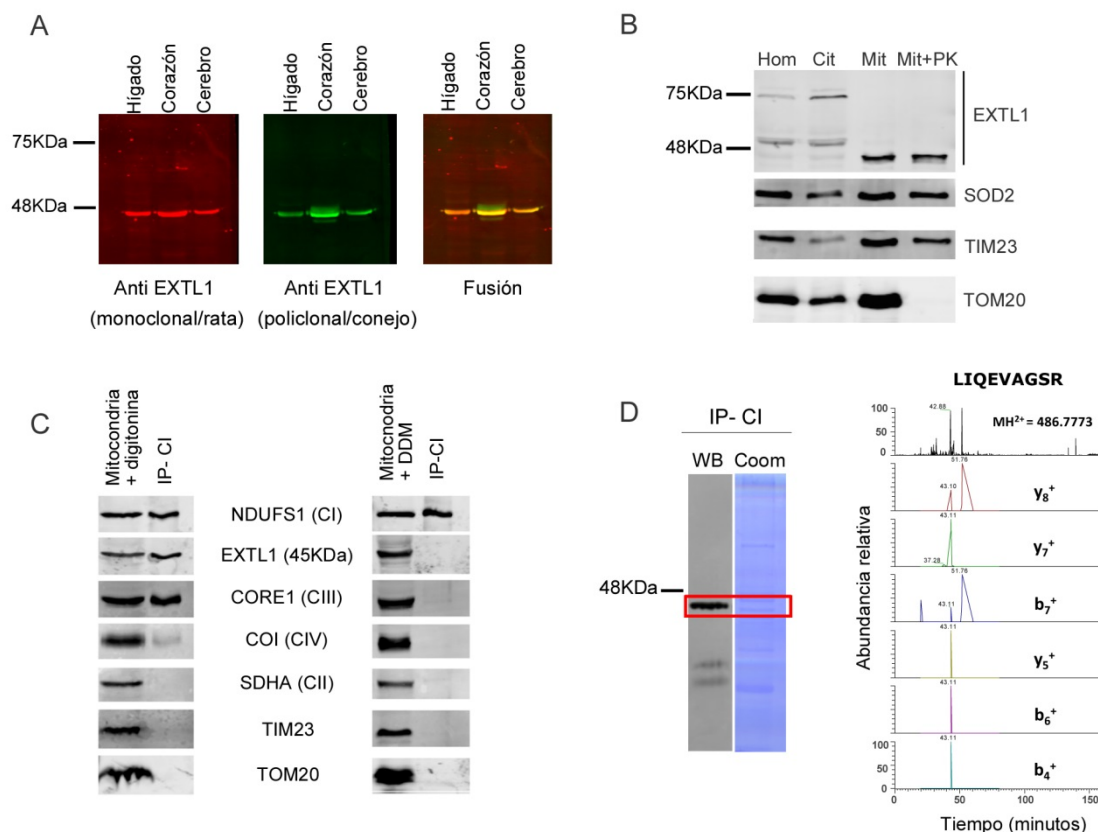


Figura II.4. Análisis, por inmunodetección, de la presencia de EXTL1 en mitocondria. **A)** Western-blot tras SDS-PAGE de proteína mitocondrial de los tejidos de ratón CD1 indicados en cada carril. Dos anticuerpos anti EXTL1, de origen diferente, revelan una banda a nivel de 45kDa, cuando el peso esperado para EXTL1 es de 72kDa. **B)** Western-blot tras SDS-PAGE de proteína contenida en muestra celular total (Hom), sobrenadante tras centrifugación para obtención de mitocondrias (Cit), mitocondria aislada (Mit) y mitocondria aislada tratada con proteinasa K para degradar toda proteína no mitocondrial (Mit+PK). El anticuerpo anti EXTL1 es capaz de detectar tres bandas: la de EXTL1 a 72kDa, una segunda banda a 52kDa y una tercera a 45kDa. Tan solo la última está localizada en mitocondria. Superóxido dismutasa mitocondrial (SOD2), como control de integridad de matriz mitocondrial. TIM23, como control de integridad de membrana interna. TOM20, proteína de membrana externa, como control de degradación de proteínas no contenidas en mitocondria. **C)** Western-blot tras SDS-PAGE de proteínas obtenidas por IP de CI. El primer carril de cada gel corresponde con la muestra original de mitocondria solubilizada sobre la que se hizo la inmunocaptura. El segundo carril de cada gel muestra las proteínas inmunocapturadas. El anticuerpo anti-EXTL1 tan sólo detecta la proteína de 45kDa en el caso de que la mitocondria sea solubilizada con digitonina, es decir sea inmunocapturado tanto CI, como CIII y CIV contenidos en SCs junto a CI. NDUFS1 como control de CI, CORE1 como control de CIII, COI como control de CIV, SDHA como control de CII, TIM23 como control de membrana interna, TOM20 como control de membrana externa. **D)** SDS-PAGE de proteínas obtenidas tras IP de CI en mitocondrias digitonizadas. Western blot (WB) anti EXTL1 y tinción con azul de Coomassie (Coom). El cuadrado rojo indica el nivel al que el gel fue recortado para la detección de EXTL1 a 45 kDa. A la derecha imagen ilustrativa de la detección del péptido proteotípico por espectrometría de masas.

La detección del péptido propio de EXTL1 a nivel de 45kDa, indica que a ese nivel encontramos una proteína de 45kDa cuyo origen puede estar en el procesamiento o degradación de la proteína EXTL1, o en el *splicing* alternativo del mRNA del gen *Extl1*. Para descartar la posibilidad de que la proteína de 45kDa tenga su origen en la degradación o procesamiento de EXTL1, se sobreexpresó en células control (FC57) la proteína EXTL1 con el epítipo HA unido a su extremo C-terminal (EXTL1HA).

Es importante destacar, en este punto, dos aspectos:

1. Los anticuerpos capaces de detectar tanto la forma original de 72 kDa, como la de 45 kDa, reaccionan con epítipos en la región C-terminal de la proteína.
2. El péptido detectado por espectrometría de masas, contenido tanto en EXTL1, como en la hipotética proteína de 45kDa, corresponde con los aminoácidos 428-435 de la

proteína EXTL1. Dado que dicha proteína está formada por 669 aas, podemos decir que el péptido compartido se encuentra más cercano a la región C-terminal.

El test de sobreexpresión de EXTL1HA, muestra que el incremento de EXTL1HA no supone incremento en las formas de 52 o 45kDa, ni aparición de proteínas con epítipo HA a menores pesos moleculares. Sin embargo, dado que el anticuerpo anti HA (en rojo) genera una tenue banda inespecífica cercana a 45kDa (ver muestras FC57 y FC57puroR, las cuales no expresan HA) se realizó un experimento más para corroborar la falta de procesamiento de EXTL1HA (**Figura II.5A**). El experimento de confirmación, fue la inmunocaptura con anticuerpo anti-HA en células que sobreexpresaban EXTL1-HA (FC57 EXTL1HA). Tan sólo la forma de 72 kDa es inmunocapturada, pudiendo por tanto descartarse que formas de menor peso molecular provengan de degradación o procesamiento de la EXTL1 original de 72kDa. Además, CI (NDUFA9) CIII (UQCRCFS1) no coprecipitaron con EXTL1 HA (**Figura II.5B**). El experimento de aislamiento de mitocondrias y tratamiento con proteinasa K fue llevado a cabo también en células FC57EXTL1HA. El resultado fue similar al expuesto en la figura II.4.B para células control. Tan solo la banda de 45kDa permanece tras tratamiento de mitocondrias con proteinasa K, aunque la cantidad de proteína EXTL1HA sobreexpresada es tan grande, que restos de ésta perduran en mitocondria (**Figura II.5C**).

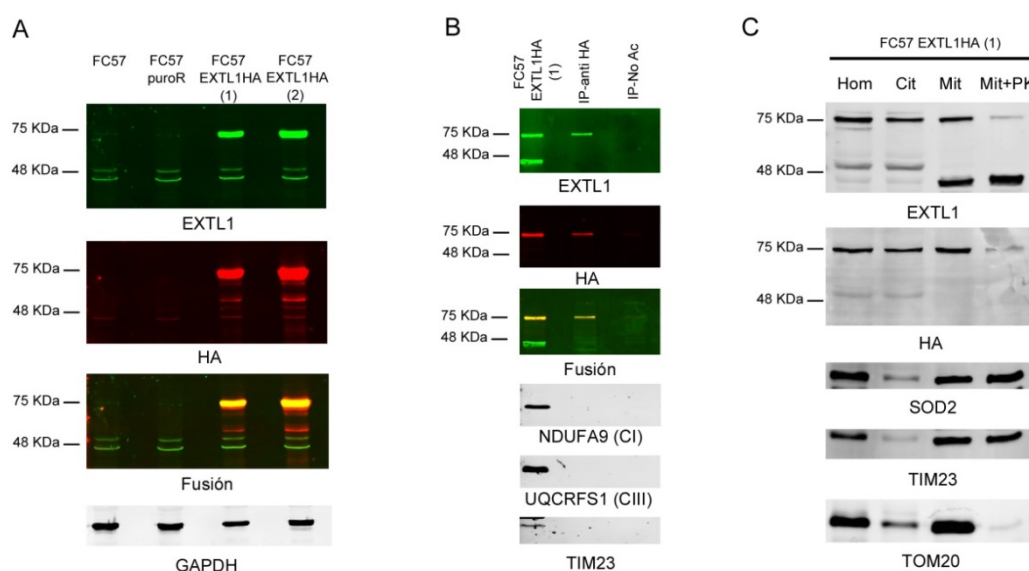


Figura II.5. Análisis de posible procesamiento o degradación de EXTL1, en células con sobreexpresión de EXTL1HA. A) Western blot tras SDS-PAGE de proteína total obtenida de células control (FC57), células control transfectadas con vector para selección de resistencia a puromicina (FC57 puroR) y células control sobreexpresando EXTL1HA (FC57 EXTL1HA (1) o (2). Anticuerpo anti EXTL1 revela tanto EXTL1 de 72 kDa como formas de 52 y 45 kDa (verde). Anticuerpo anti HA tan solo revela la proteína EXTL1HA de en torno a 72kDa. GAPDH como control de carga. **B)** Western blot tras SDS-PAGE de proteína procedente de IP de epítipo HA. En muestra de proteína total utilizada para la inmunocaptura (FC57 EXTL1HA (1) son detectadas las formas de 72 y 45kDa con anticuerpo anti EXTL1 (verde), pero tan solo la forma de 72 kDa con anticuerpo anti HA (rojo). En muestra de inmunocaptura (IP-antiHA) tan solo la forma de 72kDa es detectada, por lo que no existen bandas de 45kDa generadas a partir de EXTL1 de 72kDa. IP-No AC, IP realizada sin adición de anticuerpo, es control de adsorción inespecífica de proteína por parte del material que soporta el anticuerpo. **C)** Western-blot tras SDS-PAGE de proteína contenida en muestra celular total (Hom), sobrenadante tras centrifugación para obtención de mitocondrias (Cit), mitocondria aislada (Mit) y mitocondria aislada tratada con proteinasa K para degradar toda proteína no mitocondrial (Mit+PK). El anticuerpo anti EXTL1 es capaz de detectar tres bandas: la de EXTL1 a 72kDa, una segunda banda a 52kDa y una tercera a 45kDa. Tan solo la última está localizada en mitocondria. Superóxido dismutasa mitocondrial (SOD2), como control de integridad de matriz mitocondrial. TIM23, como control de integridad de membrana interna. TOM20, proteína de membrana externa, como control de degradación de proteínas no contenidas en mitocondria.

Tras descartar que la proteína mitocondrial de 45kDa, reconocida por anticuerpo anti-EXTL1 y que contiene el péptido proteotípico de EXTL1, fuera fruto de degradación o procesamiento de EXTL1, nuestra hipótesis paso a ser que dicha proteína podía ser una isoforma mitocondrial de EXTL1 de menor tamaño, a la que de ahora en adelante llamaremos EXTL1-45kDa.

Antes de comenzar la búsqueda de posibles isoformas mitocondriales de EXTL1, evaluamos si el patrón de migración en BN-PAGE para la proteína EXTL1-45kDa, era coherente con interacción con complejos mitocondriales.

El western blot de BN-PAGE de mitocondrias de células FC57 HA y control FC57 puroR, no pudo ser revelado con anticuerpo anti EXTL1, pues este no generó señal. Por ello, se decidió resolver dicho BN-PAGE en segunda dimensión SDS-PAGE. De esa manera se podrían exponer epítomos ocultos en geles nativos y al mismo tiempo, en el caso de que se obtuviera señal, conocer el peso molecular de la proteína detectada.

El SDS-PAGE a partir de BN-digitonina, permitió de nuevo descartar la presencia de EXTL1 en mitocondria, por su ausencia en células control FC57 puroR (**Figura II.6 A y B**). Las células FC57 EXTL1HA, que sobreexpresan gran cantidad de EXTL1HA, mostraban restos de la proteína sobreexpresada, cuya migración era totalmente inespecífica. A nivel de 45kDa, el anticuerpo anti EXTL1 fue capaz de revelar, aunque débilmente, la proteína EXTL1-45kDa (panel inferior con membrana sobreexpuesta) tanto en el caso de mitocondrias tratadas con digitonina (**Figura II.6 A**) como en las tratadas con DDM (**Figura II.6B**) El patrón de migración de EXTL1-HA fue similar al de CIII₂, tanto en tratamiento con digitonina como con DDM, lo que indica que el cambio en la migración de CIII₂ debido al cambio de detergente, fue capaz de variar la migración de EXTL1-45kDa en el mismo sentido (**Figura II.6 A y B**).

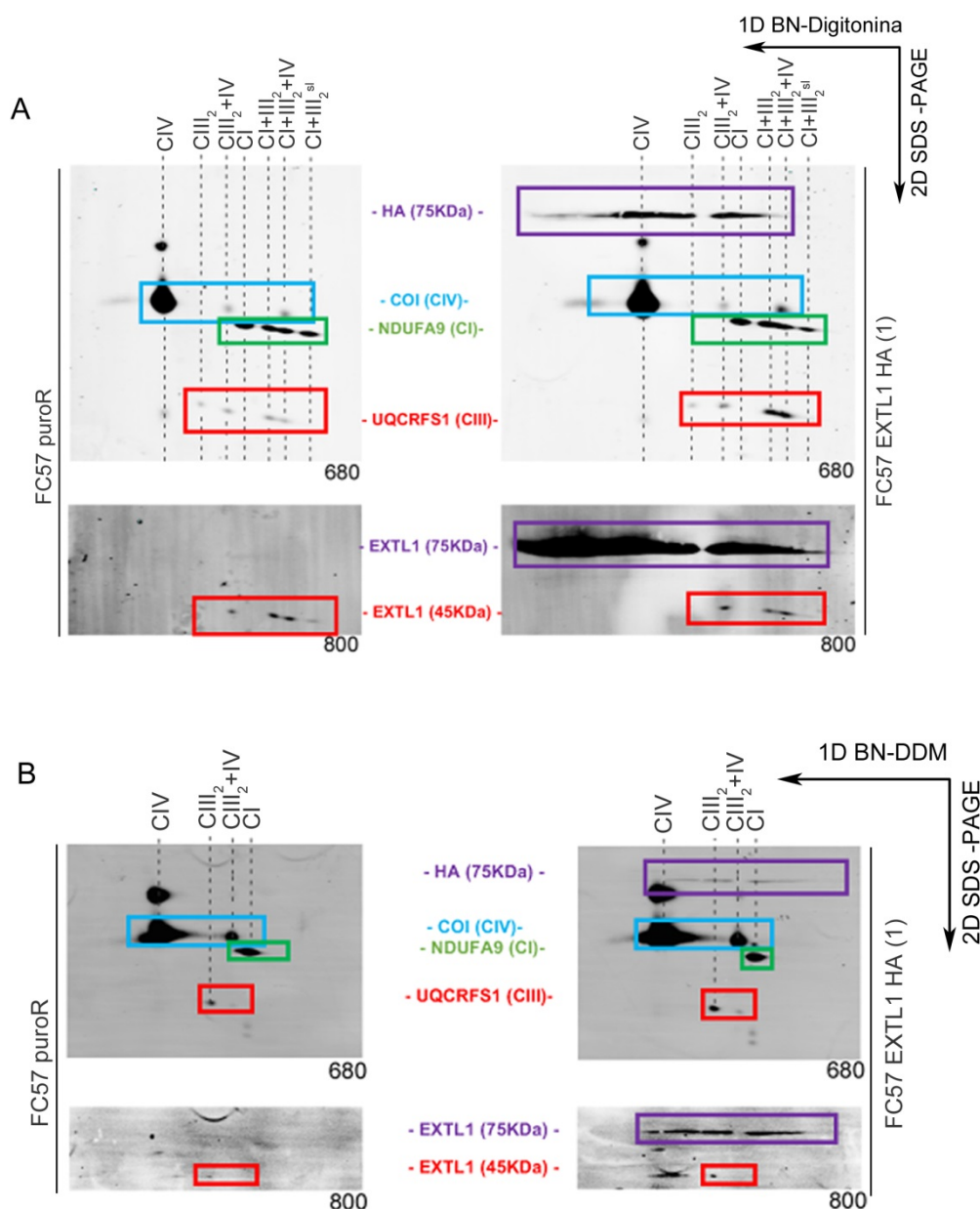


Figura II.6. Evaluación del patrón de migración de EXTL1-45kDa en células FC57. A) Western blot sobre 2D-SDS-PAGE realizado a partir de BN-PAGE en mitocondrias solubilizadas con digitonina, detergente con el que perduran las interacciones en SCs. Experimento realizado en células control FC57puroR (izquierda) o células sobreexpresando EXTL1HA (derecha). El anticuerpo anti EXTL1 no es capaz de revelar EXTL1 endógena en mitocondria, pero sí EXTL1-45kDa, cuya migración es similar a CIII. **B)** Western blot sobre 2D-SDS-PAGE realizado a partir de BN-PAGE en mitocondrias solubilizadas con DDM, detergente que rompe las interacciones entre SCs, excepto en CIII₂+IV. Experimento realizado en células control FC57puroR (izquierda) o células sobreexpresando EXTL1HA (derecha). El anticuerpo anti EXTL1 no es capaz de revelar EXTL1 endógena en mitocondria, pero sí EXTL1-45kDa, cuya migración es similar a CIII. **A) y B)** En morado, migración de EXTL1 revelada con anticuerpo anti-EXTL1 o migración de EXTL1HA revelada con anti-HA. En azul, migración de CIV. En verde, migración de CI. En rojo, migración de CIII. 680 y 800 son las diferentes longitudes de onda a las que se revela la señal de cada grupo de anticuerpos, procediendo ambas señales de una misma membrana.

El caso de BN-PAGE de mitocondrias de hígado de ratón CD1 tratadas con digitonina o DDM, el anticuerpo anti EXTL1 sí fue capaz de revelar una señal, que guardaba similitud con el patrón de migración de CIII₂. Una banda en la parte baja del carril, indicada con asterisco, no correspondía con ningún complejo respiratorio (**Figura II.7A**). La resolución

de ambos BN-PAGE por 2D SDS-PAGE permitió confirmar que EXTL1-45kDa tiene el mismo patrón electroforético que CIII₂, tanto en mitocondrias solubilizadas con digitonina, como en las tratadas con DDM. En este caso la señal fue mucho más evidente que en las muestras de cultivo celular de la figura II.6 (**Figura II.7B**). La banda inespecífica de la parte baja del BN-PAGE, que no se comporta como CIII₂ (**Figura II.7A**) resultó tener un peso molecular mucho menor de 45KDa, por lo que podría tratarse de una señal inespecífica del anticuerpo o de un producto de degradación (**Figura II.7B**).

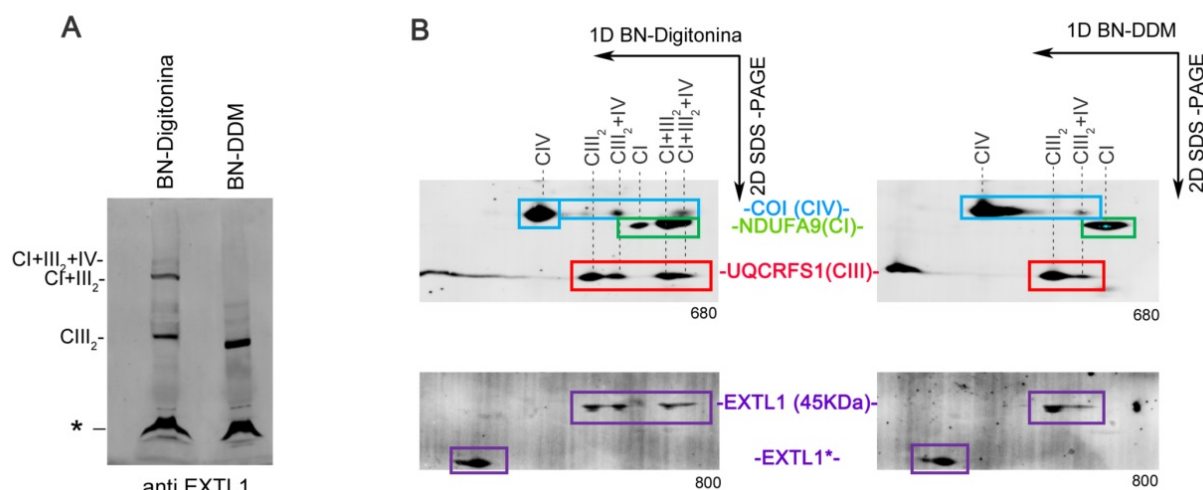


Figura II.7. Evaluación del patrón de migración de EXTL1-45KDa en mitocondrias de hígado de ratón CD1. **A)** Western blot sobre BN-PAGE de mitocondrias solubilizadas con digitonina (izquierda) o DDM (derecha) y revelado con anticuerpo anti EXTL1. El asterisco indica la banda que no corresponde con zona de migración de ningún complejo respiratorio. **B)** Western blot sobre 2D-SDS-PAGE realizado a partir de BN-PAGE en mitocondrias solubilizadas con digitonina (izquierda) o DDM (derecha). En morado, señal producida por anticuerpo anti EXTL1. EXTL1* indica la señal revelada con anticuerpo anti EXTL1 que corresponde con la banda indicada con * en A). En azul, migración de CIV. En verde, migración de CI. En rojo, migración de CIII. 680 y 800 son las diferentes longitudes de onda a las que se revela la señal de cada grupo de anticuerpos, procediendo ambas señales de una misma membrana.

La única proteína conocida generada a partir del gen *Extl1*, tanto en humano como en ratón, es la proteína EXTL1 de 72kDa localizada en retículo endoplásmico. La búsqueda en las bases de datos más habituales, no mostró existencia de variantes de *splicing*. Sin embargo, la base de datos de NCBI tiene anotadas dos posibles isoformas de EXTL1 a las que denominaremos X1 y X2 (XP_011248608.1 y XP_006539121.1) deducidas a partir del programa de predicción de NCBI denominado Gnomon, basado en evidencias de mRNA y ESTs. Ambas variantes conservan la región C-terminal de EXTL1 y el péptido detectado por espectrometría de masas. La variante X1 posee un peso molecular estimado de 45 kDa y la variante X2 de 38 kDa, por lo que la primera podría tratarse de nuestra isoforma incógnita.

La síntesis *in vitro* de las variantes X1 y X2 marcadas con [35S]- metionina, se realizó por medio del sistema TNT® de síntesis en lisado de reticulocito de conejo (Promega). La electroforesis de las proteínas marcadas radioactivamente permitió confirmar los pesos moleculares estimados de 45 kDa para la variante X1 y de entorno a 38 kDa para la variante X2 (**Figura II.8A**). El western blot sobre la membrana marcada radioactivamente demuestra que el anticuerpo anti EXTL1 es capaz de reconocer tanto EXTL1 como las variantes X1 y X2 (**Figura II.8A**). Sin embargo, ensayos de importe mostraron que estas proteínas, al menos *in vitro*, no son importadas a mitocondria (**Figura II.8A**).

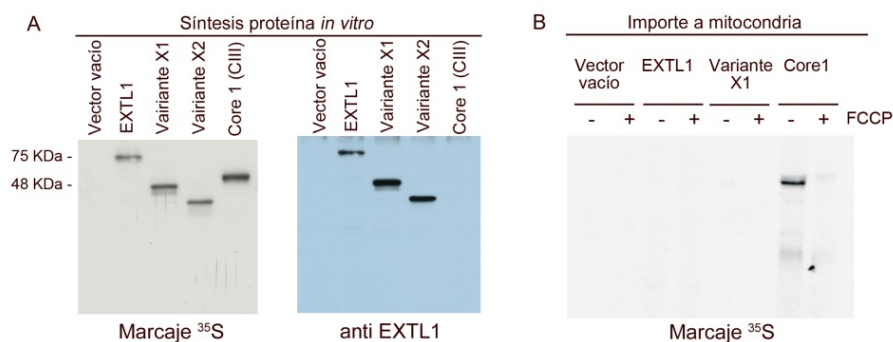


Figura II.8. Evaluación del importe a mitocondria de las hipotéticas variantes X1 y X2 marcadas radioactivamente. A) SDS-PAGE de proteínas sintetizadas *in vitro*. A la izquierda, revelado de marcaje radioactivo. A la derecha, revelado con anticuerpo anti EXTL1, capaz de reconocer tanto EXTL1 como las posibles variantes. **B)** SDS-PAGE de proteína de mitocondrias sometidas a ensayo de importe, revelado por señal radioactiva. Core 1, proteína de CIII, como control positivo de importe. El resto de proteínas no es importado. El desacoplamiento de la mETC por FCCP se usa como control de que la señal de importe es específica.

Por último, se reevaluó la presencia de la variante X1 en mitocondria, por medio de su sobreexpresión con y sin epítipo HA en células FC57. La sobreexpresión de la variante X1 generó una banda de peso molecular muy ligeramente inferior al de la proteína EXTL1-45kDa endógena (**Figura II.9. Panel central**). Además, X1 se concentra fuera de mitocondria (Cito), siendo la cantidad presente en mitocondria (Mit o Mit+PK) similar a la observada en células control FC57pR (**Figura II.9. Panel central y derecha**). La variante X1-HA sobreexpresada sí se superpone perfectamente con la EXTL1-45kDa endógena, lo que sugiere que la candidata X1 tiene en realidad un peso algo menor de lo necesario (tanto menor como es el peso molecular del epítipo HA). Se puede descartar que la variante X1-HA sea importada a mitocondria, porque no existe ni señal HA, ni mayor señal EXTL1 que en células control, en proteína mitocondrial (Mit o Mit+PK) (**Figura II.9. Panel derecha e izquierda**).

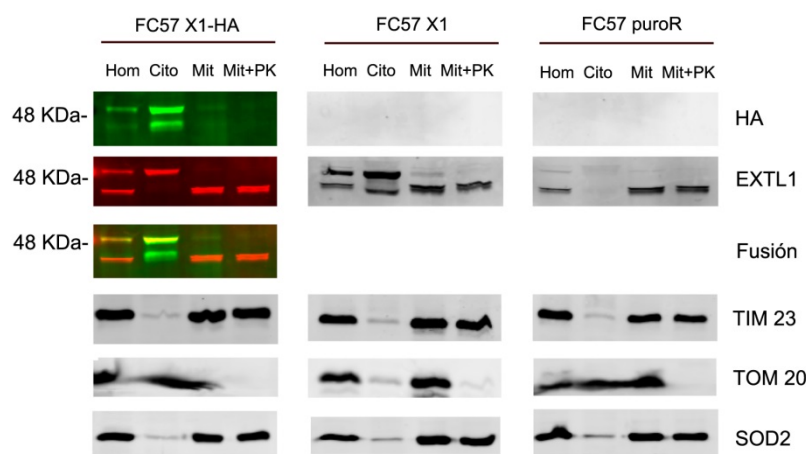


Figura II.9. Evaluación de la sobreexpresión de la hipotética variante de EXTL1 denominada X1, con epítipo HA (X1-HA) y son él (X1). Western-blot tras SDS-PAGE de proteína contenida en muestra celular total (Hom), sobrenadante tras centrifugación para obtención de mitocondrias (Cit), mitocondria aislada (Mit) y mitocondria aislada tratada con proteinasa K. FC57 X1-HA, son células FC57 sobreexpresando la hipotética variante X1 con epítipo HA en región C-terminal. FC57 X1, son células FC57 sobreexpresando la hipotética variante X1. FC57 pR son células control transfectadas con el vector sin secuencia codificante para proteína; pero con gen de selección de resistencia a puromicina. Las proteínas sobreexpresadas X1-HA y X1 no son importadas a mitocondria. Superóxido dismutasa mitocondrial (SOD2), como control de integridad de matriz mitocondrial. TIM23, como control de integridad de membrana interna. TOM20, proteína de membrana externa, como control de degradación de proteínas no contenidas en interior de mitocondria.

Todos estos datos sugieren que, de existir una isoforma mitocondrial de EXTL1, esta no es la hipotética variante X1. Se necesitan experimentos adicionales para determinar la naturaleza de la proteína asociada con supercomplejos y CIII y dilucidar, si ésta, es una isoforma mitocondrial de EXTL1. La caracterización de dicha proteína es de gran interés por su posible implicación en la formación o regulación de supercomplejos.

Discusión

I. DISCUSIÓN GENERAL.

El estudio de la organización del sistema OXPHOS, y más concretamente de la cadena de transporte electrónico, ha sido objeto de debate por mucho tiempo. El “modelo fluído”, aceptado por varias décadas, según el cual los componentes de la mETC difundirían libremente en la membrana interna mitocondrial, fue puesto en cuestión en el año 2000, con el trabajo del Dr. Schägger y colaboradores, en el cual se mostró la existencia de asociación física entre complejo respiratorios (Hackenbrock et al 1986, H Schägger and Pfeiffer 2000). Tras años de prolífica producción científica en torno a este tema, a día de hoy la existencia de supercomplejos respiratorios es ampliamente aceptada. Dos modelos generados por criomicroscopía electrónica del respirasoma, el supercomplejo compuesto por CI, CIII₂ y CIV, han sido recientemente publicados (Gu et al 2016, Wu et al 2016). Por tanto, el debate en torno a los supercomplejos se centra ahora en torno a su significado fisiológico.

Nuestro grupo propuso en 2008 el “modelo plástico”, capaz de aunar evidencias físicas y cinéticas a favor del “modelo fluído” y de la existencia de supercomplejos. Este modelo, propone que la cadena de transporte electrónico presenta un comportamiento dinámico y la asociación entre complejos sería modulada en función a estímulos, probablemente, de índole metabólica (Acín-Pérez et al 2008). Por tanto, este modelo confiere a la organización de la cadena de transporte en supercomplejos, una gran importancia fisiológica. La primera caracterización de un fenómeno adaptativo en la cadena de transporte electrónico fue realizada por nuestro grupo en un trabajo publicado en 2013. De las evidencias mostradas en este trabajo, se desprende un modelo de organización y reorganización de complejos respiratorios, con dos puntos de regulación específicos, a nivel de la asociación de CI con CIII₂, y de CIII₂ con CIV (Lapiente-Brun et al 2013).

La asociación de CIII₂ con CI es preferencial, de forma que la liberación de CIII₂ de su asociación en supercomplejos con CI, incrementa la respiración por otras enzimas CoQ reductasas como CII. Este fenómeno, observado en modelos celulares en que la cantidad de CI y CII fue regulada con herramientas genéticas, fue reproducido en condiciones fisiológicas. Animales forzados al uso de ácidos grasos por ayuno vieron disminuída la cantidad de CI, al mismo tiempo que se incrementaba la respiración por CII sin incremento de este complejo; lo cual sólo puede ser interpretado como una reorganización del flujo electrónico en la cadena. En el modelo propuesto, esta reorganización responde a la optimización en la entrada de electrones de diferentes fuentes. El CII y resto de enzimas, libres en la membrana y capaces de reducir CoQ, aportan electrones desde FADH₂, mientras que CI asociado mayoritariamente a CIII₂, lo hace a partir de NADH. Dado que diferentes sustratos generan diferentes proporciones NADH y FADH₂ en su oxidación, el CI ha de disminuir, para liberar CIII₂ y permitir la entrada de electrones por otras vías en las situaciones en que el ratio NADH/FAHD₂ sea incrementado, como en el caso del consumo de ácidos grasos (Lapiente-Brun et al 2013).

En este trabajo de tesis, se ha caracterizado el mecanismo molecular implicado en la degradación de CI para la liberación de CIII₂ y la optimización de entrada de electrones a partir de diferentes sustratos. El mecanismo propuesto, primeramente caracterizado en células con carencia de CI y después reproducido en condiciones fisiológicas, implica el incremento en la proporción de CoQH₂ y la producción de ROS por transporte reverso de electrones. El daño oxidativo producido en cisteínas específicas de CI es el responsable de su propia degradación. Nuestro modelo, que propone un papel fisiológico para el transporte reverso de electrones, plantea que el incremento de ácidos grasos como fuente de energía,

aumenta la entrada de electrones a la cadena a partir de FADH_2 , activando dicho mecanismo para la liberación de CIII_2 y su uso por CII y ETF-QO (**Figura I**) (Guarás et al 2016).

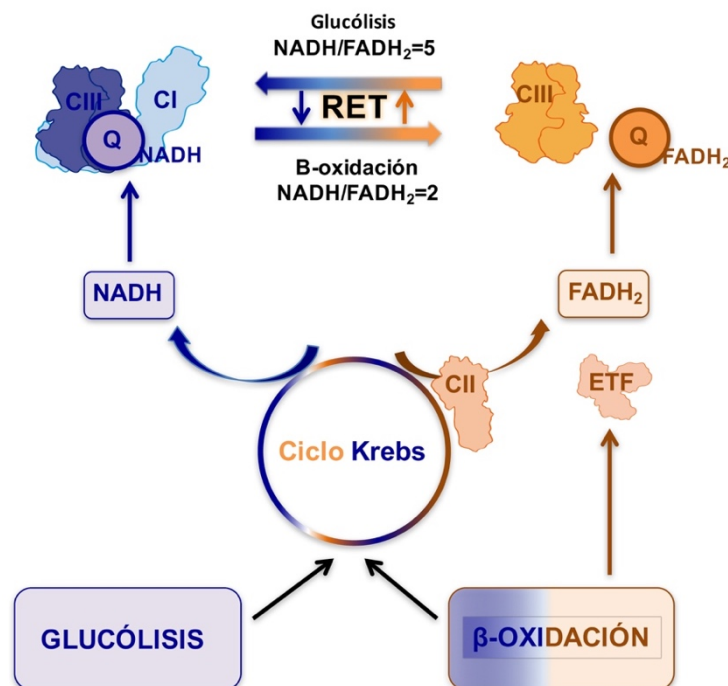


Figura I. Propuesta de papel fisiológico de transporte reverso de electrones (RET). El tipo de sustrato oxidado como fuente de energía determina una ratio diferente entre los equivalentes de reducción contenidos en NADH o FADH_2 . Una ratio mayor, implica mayor entrada de electrones a través de CI, haciendo perdurar la asociación entre CIII_2 y CI. Una ratio menor, activa RET, degradando parcialmente CI y liberando CIII_2 de su asociación con CI, de modo que enzimas dependientes de FAD pueden incrementar su aporte de electrones a la cadena de transporte.

Volviendo al modelo propuesto en 2013, a nivel de asociación de CIII_2 con CIV, fue descrito el otro punto de regulación de flujo electrónico en la cadena. El descubrimiento del primer factor de ensamblaje de supercomplejos respiratorios (SCAF1), encargado de la asociación entre CIII_2 y CIV, permitió demostrar cómo dicha asociación permite prevenir la saturación de la cadena por un solo sustrato (Lapiente-Brun et al 2013). La búsqueda de nuevos factores de ensamblaje y de posibles proteínas reguladoras de la función de supercomplejos, es un paso necesario para el entendimiento de la plasticidad de la cadena de transporte y permitiría regular la función de la misma, ya sea para el estudio de su fisiología o como futura diana terapéutica.

Para abordar este segundo objetivo, se realizó la caracterización del complexoma mitocondrial, es decir, la caracterización de las asociaciones entre proteínas mitocondriales, en colaboración con el grupo de proteómica del Dr. Jesús Vázquez del CNIC. Para ello, geles nativos de BN-PAGE a partir de muestras de mitocondrias control y mutantes para diferentes componentes de la cadena, fueron fraccionados y analizados por cromatografía líquida acoplada a espectro de masas, de manera que se obtuvo un perfil de migración de cada proteína contenida en el gel. El estudio de correlación entre el perfil de migración de todas esas proteínas y del CI, permitió obtener un candidato para la interacción con dicho complejo, la proteína EXTL1. Resultados preliminares sugieren que una isoforma mitocondrial de esta proteína, con probable actividad glicosiltransferasa interacciona con CIII y con CI a nivel de supercomplejos. Más estudios serán necesarios para confirmar esta hipótesis.

En resumen, esta tesis contribuye al debate sobre el significado fisiológico de los supercomplejos, aportando evidencias de la naturaleza dinámica de la cadena de transporte electrónico mitocondrial.

II. DISCUSIÓN: ESTUDIO DEL MECANISMO RESPONSABLE DE LA OPTIMIZACIÓN DE LA ENTRADA DE ELECTRONES A LA CADENA DE TRANSPORTE.

Una de las funciones atribuidas a los SCs, es la estabilización de los complejos respiratorios debido a la asociación física entre ellos. Esta hipótesis, cobra especial importancia en el caso de CI, pues resulta ser el complejo que mayor dependencia estructural presenta por otros componentes de la mETC. En pacientes, han sido descritas deficiencias combinadas de varios complejos por defecto primario en uno sólo de ellos. Principalmente se observaron defectos en CI derivados de fallos en ensamblaje o función de CIII y CIV. Este fenómeno es además un motivo de variabilidad fenotípica entre pacientes con defectos en origen similares (Fernandez-Vizarra et al., 2007; Lamantea et al., 2002; Morán et al., 2010). La relación entre estabilidad de CI y formación de SCs se considera tan estrecha, que incluso ha llegado a proponerse que el ensamblaje en SCs es paso necesario para el ensamblaje íntegro de CI (Moreno-Lastres et al 2012).

La caracterización del mecanismo responsable de la degradación de CI, en células con pérdida de CIII, CIV y Cit c, permitió descartar, al menos parcialmente, que el CI presente dependencia por la asociación física en SCs. Si bien es cierto que el CI, reensamblado por diferentes aproximaciones, tiene tendencia a la rápida asociación con los complejos aún presentes, la inestabilidad de CI ha sido revertida en ausencia de CIII, CIV y Cit c. El modelo aquí expuesto también descarta que CI precise de la existencia de respirasoma para su completo ensamblaje y funcionalidad. Otros estudios han mostrado también resultados en contra de esa hipótesis, como es el caso del reciente trabajo de caracterización del ensamblaje de CI, en el cual entre otras evidencias en contra, se muestra la no caracterización de SCs que contengan CI parcial (Guerrero-Castillo et al 2016). Cabe destacar, sin embargo, que en situaciones no fisiológicas en que un CI parcial carente de módulo N es acumulado en la célula, éste es capaz de asociarse con CIV y/o CIII íntegro para formar SCs, tras lo cual es finalmente ensamblado. Este fenómeno es claramente ilustrado en los experimentos de reensamblaje de CI tras degradación por tratamiento con DPI, compuesto que en esta tesis se describe que es capaz de degradar CI. El fenómeno de reemplazo de subunidades del módulo N sobre un CI parcial preexistente, fue previamente postulado y se interpreta como un mecanismo para prevenir el daño oxidativo en las proteínas más expuestas a él (Dieteren et al 2012, Lazarou et al 2007).

La primera evidencia de que la carencia de CI en mutantes de CIII, CIV y Citc, era debida a causas funcionales, fue la estabilización de CI por expresión de AOX. La enzima AOX ha sido propuesta para contribuir al ensamblaje y estabilidad de CI en organismos en los que se expresa de forma natural, como en el caso de *Podospira anserina* (Krause, Scheckhuber, et al 2004, Maas et al 2009), *Yarrowia lipolytica* (Guerrero-Castillo et al 2009) y *Neurospora crassa* (Duarte and Videira 2009). El mecanismo por el cual AOX mediaría la estabilidad de CI, no ha sido descrito y, tan sólo en el caso de *Neurospora crassa*, fueron mostradas evidencias de interacción física. El mecanismo aquí propuesto, según el cual la prevención de la reducción de CoQ restaura el ensamblaje de CI, podría explicar el fenómeno de estabilización en estos organismos.

El estudio del mecanismo de degradación de CI, con implicación del incremento en la reducción de CoQ, llevó a la descripción de un proceso según el cual, la generación de ROS mediado por RET en CI, conlleva su degradación por daño oxidativo.

La implicación de ROS en la desestabilización de CI por defecto en CIII, fue también descrita en células con carencia de la proteína sulfo-férrica Rieske, las cuales presentan pérdida de la mayor parte de CIII funcional. En estas células, el tratamiento con hipoxia, fue capaz de restaurar parte del CI perdido, del mismo modo que en el trabajo aquí expuesto (Diaz et al 2012). El hecho de que, a pesar de la implicación de ROS en el mecanismo descrito, la sobreexpresión de SOD2 produzca una estabilización tan débil del CI, sugiere que la fuente de ROS debe estar localizada en un lugar inaccesible para los sistemas de detoxificación, o bien que la cantidad y velocidad de producción de estas especies sobrepasa a estas defensas.

El transporte reverso de electrones, es decir la transferencia de electrones desde CoQH_2 a CI, es bloqueado utilizando rotenona, inhibidor del sitio de unión de CoQ en CI. Esta estrategia es utilizada de rutina en el estudio de producción de ROS en mitocondria aislada, en la cual el mayor incremento de ROS es producido vía succinato tan sólo en ausencia de rotenona (Hirst et al 2008), y fue esencial para definir la implicación de RET en el proceso descrito en nuestro modelo celular.

Existe cierta controversia en cuanto al modo en que ROS es producido en CI vía RET. La propuesta más aceptada es que el superóxido es generado a nivel del cofactor FMN, con o sin reducción de NAD^+ . Hirst y colaboradores mostraron como evidencia en ese sentido, el hecho de que el ROS producido vía FET sólo es bloqueado por inhibidores de unión a flavina como DPI, mientras que en el caso de RET, tanto DPI como rotenona son capaces de inhibir la producción de superóxido (Pryde and Hirst 2011). Existe otro modelo según el cual, RET y FET producirían ROS en diferentes regiones de CI. Según este modelo, DPI inhibiría RET por un mecanismo diferente a la unión a FMN (Lambert et al 2008).

El tratamiento con DPI de células mutantes en CIV, no fue capaz de estabilizar el CI en nuestro modelo. Este resultado, en principio incoherente, es justificado con facilidad al estudiar el comportamiento de células control en presencia de inhibidores. Mientras que la rotenona, inhibidor de RET, es capaz de estabilizar CI en mutantes sin efecto sobre células control; el DPI, también inhibidor de RET, degrada CI totalmente en células control. Este fenómeno, que en principio no parece guardar relación con el mecanismo estudiado, explica por qué células mutantes en CIV no estabilizan CI en tratamiento con DPI. Aunque RET sea inhibido, otro mecanismo produce la degradación de CI.

La capacidad de DPI para degradar CI por medio del desensamblaje del módulo N, es un hallazgo sorprendente con grandes implicaciones para el estudio de la fisiología mitocondrial. Con esta herramienta es posible degradar el CI generando una deficiencia total o parcial de manera controlada y, en principio, sin incremento en la producción de ROS (esto último no ha sido evaluado pero se desprende de la literatura) (Lambert et al 2008, Pryde and Hirst 2011).

El DPI fue primero descrito como agente hipoglucemiante (Lardy 1973). Más tarde se caracterizó su capacidad para inhibir la producción de superóxido generada por NADPH oxidasas en neutrófilos y macrófagos (Cross and Jones 1986, Hancock and Jones 1987) y para inhibir la óxido nítrico sintasa en macrófagos (Stuehr et al 1991). La caracterización de DPI como inhibidor irreversible y no competitivo de CI, capaz de reaccionar con la flavina reducida, es posterior (Majander et al 1994). El uso de DPI, tanto *in vitro* como *in vivo*, para

la inhibición de ROS producido por NADPH oxidasas implica, como el uso de todo compuesto no específico, una serie de efectos no deseados entre los que podría encontrarse la degradación de CI. Las dosis utilizadas en estudios *in vitro* para inhibición de NADPH oxidasas, son mucho mayores a las utilizados en los experimentos aquí expuestos, si bien se trata de tipos celulares diferentes (Cross and Jones 1986, Prasad R, Kappes JC 2016). En cuanto a los estudios realizados *in vivo*, la interpretación de los resultados debería ser reevaluada en función de la presencia o ausencia de CI. Un ejemplo es el estudio en que se atribuye a la supresión de respuesta inflamatoria la neuroprotección ejercida por DPI, sin previa evaluación del estado de inhibición y estabilidad de CI (Nagel et al 2012). Del mismo modo debería ser evaluada la estabilidad de las enzimas NADPH oxidasas y óxido nítrico sintasa en presencia de DPI.

El análisis proteómico de la degradación de CI en el modelo de hipoxia-reoxigenación, permitió caracterizar, por un lado, la secuencia de degradación de las subunidades de CI y por otro, la existencia de daño oxidativo en cisteínas específicas de CI. Las subunidades de los módulos NADH deshidrogenasa e hidrogenasa fueron degradados más rápidamente que el resto de proteínas de CI. Las subunidades NDUF51 y NDUFV1, del módulo N, se mostraron como las más sensibles a reoxigenación. En particular, las cisteínas Cys⁷⁸ y Cys⁹², implicadas en formación de centros sulfoferricos de NDUF51, mostraron gran sensibilidad a reoxigenación, con las formas reducidas reemplazando progresivamente a las oxidadas. El daño a centros sulfoferricos, de tratarse del origen del daño oxidativo, implicaría la acción de anión superóxido en el proceso. El anión superóxido, que suele mediar daño oxidativo local, es capaz de reaccionar con centros sulfoferricos desensamblándolos por liberación del hierro. El peróxido de hidrógeno, una molécula usualmente implicada en señalización celular, y que suele interaccionar con grupos tiolato, reacciona sólo débilmente con centros sulfoferricos (Bachi et al 2013). Las Cys⁴⁶³ y Cys⁵⁵⁴ con un comportamiento también coherente con daño oxidativo, fueron junto con la Cys⁹² de centro sulfoferrico, tres de las únicas seis cisteínas que resultaron específicamente oxidadas en un modelo de daño cerebral por disminución de glutathione (Danielson et al., 2011). Otros trabajos mostraron también una susceptibilidad a oxidación específica en cisteínas de NDUF51 y NDUFV1, por adición de glutathione o por S-nitrosilación (Burwell et al 2006, Taylor et al 2003). Cabe destacar que estas subunidades se encuentran entre las más afectadas por la disminución del factor de ensamblaje de centro sulfoferricos Ind1 (Sheftel et al 2009). El hecho de que la degradación del complejo comenzara por los módulos localizados en el brazo hidrofílico, aquellos donde parece producirse el daño oxidativo, sugiere que el ROS derivado de RET se produce a nivel de la flavina. Esta observación se enmarca dentro del modelo unificado de producción de ROS en CI, que plantea que tanto en FET como en RET, el anión superóxido es producido en el cofactor FMN (Pryde and Hirst 2011).

Nuestros resultados sugieren que el mecanismo que produce la degradación de CI en células con deficiencia en CIII, CIV y Cit c, está también implicado en la pérdida parcial de CI durante la reconfiguración de la mETC en respuesta al cambio en la ratio NADH/FADH₂. La función del estado redox de CoQ como sensor metabólico capaz de disparar el ajuste en la cantidad de CI, explica además que CI presente dependencia estructural de la estabilidad y actividad de CIII y CIV.

Otro aspecto puesto de manifiesto en este trabajo es la relación estructural entre CII y CI. RET es capaz de desestabilizar CI, además de por la ausencia de CIII y CIV, por la activación de CII. Este fenómeno de degradación vía RET podría tener lugar, no sólo por el incremento directo en la entrada de electrones por CII debida a cambio de sustrato, sino también por la activación de CII por medio de peróxido de hidrógeno. Nuestro grupo describió en 2014 la activación de CII por medio de la quinasa Fgr, en respuesta al

incremento de peróxido de hidrógeno producido en ciertos contextos fisiológicos. En particular, esa activación fue descrita en procesos que implican un cambio metabólico con adaptación de la mETC, como es el caso de la activación de linfocitos T. En este trabajo de tesis, la activación *in vitro* de CII por H_2O_2 fue llevada a cabo para confirmar la inducción de RET y la respuesta de desestabilización de CI; pero probablemente en contextos fisiológicos en que CII es activado vía H_2O_2 , la producción de ROS vía RET esté mediando el balance CI/CII.

Otra evidencia a favor de la regulación del balance CI/CII, por medio de la activación de CII, es la pérdida de CI en un modelo de *C. elegans* con sobreexpresión de CII (Pujol et al 2013). La desestabilización de CI en ese modelo pudo ser revertida por tratamiento con rotenona, lo que confirma que el mecanismo capaz de regular ese balance es el incremento de RET a partir de CII.

Este trabajo, publicado en 2016, fue uno de los primeros en proponer un papel fisiológico para el RET (Guarás et al 2016); pero en lo últimos años varios estudios han descrito su implicación como señalizador metabólico en fenómenos patológicos o fisiológicos.

En 2014 fue descrita la implicación del RET en la producción de daño oxidativo por isquemia-reperfusión. El succinato, acumulado selectivamente durante hipoxia, es oxidado tras perfusión disparando la producción de ROS en CI vía RET (Chouchani et al 2016).

Un trabajo publicado también en 2016, propone una novedosa explicación para la aparente contradicción que supone el hecho de que el incremento de ROS, considerado generalmente un proceso implicado en envejecimiento, se encuentre implicado en la extensión de la esperanza de vida en *C. elegans* y *Drosophila*. La regulación de la sobreredución de CoQ y de su reoxidación, por medio de la expresión de NADH deshidrogenasa alternativa NDI1 y de la oxidasa alternativa AOX, respectivamente, permitió el estudio de la fuente específica de ROS durante el análisis de la esperanza de vida en *Drosophila*. Con esta estrategia fue posible determinar el papel protector del ROS producido específicamente vía RET, en relación a envejecimiento (Scialo et al 2016).

Ha sido propuesta también, la inducción de RET por el cambio metabólico sufrido en macrófagos tras activación por receptores de inmunidad innata. En un modelo de activación de macrófagos por medio de bacterias viables, se observó que el incremento en el uso de glutamina como fuente de energía, produjo cambios en la organización de la mETC. CI fue parcialmente desensamblado y la actividad de CII incrementada. Esta reorganización de la mETC se interpretó como una posible adaptación al cambio en la ratio NADH/FADH₂ vía RET, aunque los autores no descartan otra posible explicación relacionada con el aumento de ROS fagosomal (Garaude et al 2016). Un trabajo independiente confiere al incremento de la oxidación de succinato, del potencial de membrana y de la producción de ROS durante la activación de macrófagos, un papel crucial en la determinación del fenotipo proinflamatorio. Su estrategia de análisis, la cual incluye inhibición de CII, expresión de AOX y tratamiento con rotenona, permite proponer la implicación de RET en el mecanismo de adaptación metabólico que conduce a la activación de macrófagos (Mills et al 2016).

En definitiva, este trabajo de tesis propone la mediación de RET en la adaptación de la mETC en respuesta al cambio de sustrato y pone de manifiesto la relación entre el estado redox de CoQ y la reorganización de la mETC. Este mecanismo, junto con la remodelación de las crestas mitocondriales (Cogliati et al 2013), confirma la existencia de rutas

encargadas de la regulación de la asociación de los SCs respiratorios, lo que ahonda en la visión dinámica de la cadena de transporte electrónico.

III. DISCUSIÓN: BÚSQUEDA DE FACTORES IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE LOS SUPERCOMPLEJOS RESPIRATORIOS.

Hasta la fecha, un solo factor específico de ensamblaje de SCs, denominado SCAF1, ha sido descrito (Lapuente-Brun et al 2013). Algunas otras proteínas, como Rcf1 y Rcf2 fueron propuestas como factores de ensamblaje en *S.Cerevisiae*, sin embargo, a pesar de que su carencia implica pérdida de SCs, su función es más acorde con la de factores de ensamblaje de CIV (Yu Chan Chen et al 2012, Strogolova et al 2012, Vukotic et al 2012). En cuanto a proteínas reguladora de ensamblaje o función de SCs, tan sólo MCJ/DnaJC15 ha sido propuesta. Esta proteína, capaz de disminuir la actividad de CI, también disminuye la formación de SCs (Hatle et al 2013).

La identificación de nuevos factores de ensamblaje de SCs y proteínas reguladoras de su función, es necesaria para aumentar el conocimiento sobre la naturaleza dinámica de la mETC. Su caracterización permitiría además modular la asociación y función de SCs. Con esas herramientas, resultaría más sencillo establecer la relación causal entre la actividad de los SCs y la fisiología mitocondrial, e incluso podrían llegar a ser utilizadas como diana terapéutica.

Entre las estrategias utilizadas para la caracterización de SCAF1 como factor de ensamblaje, se encontraba el análisis de su migración en geles de BN-PAGE por medio de espectrometría de masas. SCAF1 fue detectado a nivel de respirasoma y III₂+IV; pero no a nivel de esos mismos complejos libres (Lapuente-Brun et al 2013)

El estudio de la cuantificación de todas las proteínas mitocondriales contenidas a lo largo de geles de BN-PAGE fue llevado a cabo, en primer lugar, en células HEK293. Los geles fueron cortados en 24 bandas sometidas a digestión e identificación posterior de las proteínas que contenían por LC-MS/MS. Tras la caracterización del perfil de migración de cada proteína, se estableció el coeficiente de relación entre ellos con el propósito de revelar interacciones (Wessels et al 2009). Esta es, en esencia, la estrategia que han seguido los análisis de complexoma mitocondrial que se han desarrollado de aquí en adelante y que han permitido, entre otras cosas, la caracterización del factor de ensamblaje de CI TEM126B y la definición de la ruta de ensamblaje de CI (Guerrero-Castillo et al 2016, Heide et al 2012).

La optimización de este tipo de análisis se basa, actualmente, en dos tipos de mejoras. Por un lado, una nueva estrategia para el troceado del gel ha sido puesta punto recientemente. Esta técnica permite el fraccionamiento del gel en 230 bandas por medio de por crio-microtomo, aumentando espectacularmente la resolución de los perfiles de migración (Müller et al 2016). Por otro lado, la mejora en la sensibilidad de las técnicas de identificación de proteínas por espectrometría supondría un avance evidente para este tipo de estrategia. Es por ello que se decidió realizar un análisis de perfil del complexoma mitocondrial utilizando un nuevo método de adquisición de datos por espectrometría, mucho más sensible y reproducible que lo utilizados hasta ahora para la resolución del complexoma mitocondrial. Dicho método, denominado DIS (*Data independent Scanning*) puesto a punto en el grupo de proteómica del Dr. Jesús Vázquez en el CNIC, permitió

generar una base de datos con el perfil de migración de cada proteína identificada, entre las cuales se encontraban el 80% de las consideradas de localización mitocondrial.

La información relativa a la migración electroforética permitió la generación de una matriz de correlación de todas las proteínas detectadas en el gel para mitocondrias control (hígado, corazón y cerebro de ratones CD1 y fibroblastos de ratón FC57). En este análisis se detectaron las asociaciones entre proteínas de complejos previamente conocidas, como es el caso de los complejos respiratorios, los componentes ribosomales o el complejo MICOS.

Además de las muestras control, también fue analizado el complexoma de tres modelos de deficiencia en la mETC, las líneas celulares ρ^0 929 (carentes de CI, CIII, CIV y parte de CV), ND4^{KO} (carente de CI) y Cox10^{KO} (carente de CIV y CI). El uso de células con ausencia de ciertos complejos respiratorios fue utilizado como control para discernir entre comigración en gel e interacción real. Proteínas que arrojaran un alto coeficiente de correlación con el perfil de migración de un determinado complejo respiratorio en muestras control, debían comportarse del mismo modo que dicho complejo en células mutantes, en las cuales el perfil de los complejos es diferente por ausencia de alguno de ellos y de sus asociaciones con otros.

El análisis de células deficientes en complejos, permitió también confirmar que las asociaciones entre complejos reveladas por BN-PAGE son previas al tratamiento con detergentes, como se desprende del hecho de que la pérdida de un complejo en la célula suponga el cambio de migración de los complejos que en condiciones control comigran con él en gel. Este resultado, que puede parecer una obviedad una vez aceptada la existencia de los SCs, es un argumento en contra de la consideración de los SCs como artefactos visualizados en gel y derivados de la solubilización de membranas.

A partir del estudio de correlación entre el perfil de migración de todas las proteínas detectadas en gel y el perfil de CI, se obtuvieron 4 candidatos para la interacción con este complejo. El mejor de ellos, la proteína EXTL1, se comporta como CI especialmente a nivel de SCs, lo que justifica su alto coeficiente de correlación.

EXTL1 es, como se explica en el apartado de resultados dedicado a su validación como interactor de CI, una proteína de la que poco se conoce. Su posible localización y potencial actividad son deducidas a partir de las características de otras proteínas contenidas en la misma familia, en la que se encuentra incluida por homología de secuencia a nivel génico (C Wise et al 1997). EXTL1 pertenece a la familia de las denominadas exostosinas, nombre derivado del “síndrome de exostosis múltiple” generado por mutaciones en los principales miembro de la familia, EXT1 y EXT2 (Busse et al 2007). Estas proteínas son glicosiltransferasas transmembrana dedicadas a la síntesis de heparán sulfato, por lo que poseen dominios de unión de UDP (Zak et al 2002). EXTL1 posee en común con estas glicoproteínas tanto dominio DXD para unión de UDP, como homología en la zona C-terminal y en ciertas cisteínas de importancia estructural (Zak et al 2002). En principio, EXTL1 se supone localizada en retículo endoplásmico y no existe evidencia alguna, ni de su presencia ni de la de otro miembro de la familia exostosina, en mitocondria (McCormick et al 2000).

Una primera evaluación de la presencia de EXTL1 en mitocondria mostró su ausencia en este orgánulo. Los resultados obtenidos sugieren la existencia de una nueva isoforma mitocondrial de menor tamaño, la cual fue identificada por dos anticuerpos de diferente fuente y por espectrometría de masas tanto en mitocondria como en inmunocaptura de CI previo tratamiento con digitonina. El hecho de que el tratamiento con DDM previo a la inmunocaptura de CI elimine la isoforma mitocondrial de EXTL1, sugiere que dicha

proteína interacciona con CI sólo en presencia de CIII y/o CIV. En efecto, los análisis de comigración entre EXTL1 y complejos respiratorios mostraron que la proteína interacciona con CI tan sólo a nivel de SCs que contienen CIII, pues su comportamiento en gel es exacto al de CIII.

La discordancia entre los datos obtenidos por análisis proteómico y validación por inmunodetección sugieren que esta proteína probablemente cumpla su función a nivel de SCs, aunque su interacción sea preferencial con CIII.

Dado que no han sido descritas variantes generadas por *splicing* a partir del gen EXTL1, se realizó la búsqueda de nuevas isoformas por medio de herramientas bioinformáticas a partir de bases de datos con secuencias obtenidas de mRNAs. Una de las dos proteínas predichas resultó ser el candidato perfecto para ser la isoforma mitocondrial incógnita. Dicho candidato poseía el peso molecular estimado adecuado, conservaba la región reconocida por los anticuerpos utilizados, contenía el péptido identificado por espectrometría de masas y poseía el dominio DXD relacionado con la actividad glicosiltransferasa propia de la familia. Sin embargo, el intento de validación por medio de importe *in vitro* y sobreexpresión en células arrojó resultado negativo. Más análisis serán necesarios para caracterizar la supuesta nueva isoforma mitocondrial.

En cuanto a la posible función de esta posible isoforma mitocondrial, se podría especular que posea algún tipo de actividad glicosiltransferasa en mitocondria. La actividad de EXTL1 no ha sido descrita. Ciertas actividades glicosiltransferasa implicadas en la síntesis de cadenas de heparán sulfato fueron evaluadas *in vitro*, en una forma soluble de EXTL1, sin dominio transmembrana. Tan solo una de ellas, la transferencia de grupos GlcNAc sobre grupos GlcA fue confirmada, aunque la actividad mostrada fue muy inferior a la presentada por otros miembros de la familia exostosina (Kim et al 2001).

La glicosilación por medio de β -acetil glucosamina (O-GlcNAc) es un tipo de modificación postraducciona realizada sobre residuos serina o treonina y que por tanto compete con fosforilación. Las enzimas del metabolismo del O-GlcNAc, se encuentran muy compartimentalizadas y reguladas. La transferencia del grupo O-GlcNAc es el paso final de la ruta de señalización por hexosamina, que responde al exceso de nutrientes activando la acetilglucosaminación y regulando principalmente rutas localizadas en núcleo y citoplasma (Dona C Love and Hanover 2005). Sin embargo, el papel de este tipo de modificaciones en regulación de función mitocondrial ha cobrado gran importancia en los últimos años (Zheng et al 2016). La glicosilación mitocondrial tiene lugar por medio de la isoforma mitocondrial de la proteína O-GlcNAc transferasa. Cabe destacar que dicha isoforma, generada por *splicing* alternativo, está implicada en señalización de procesos muy diferentes a los que son señalizados por la isoforma nuclear, lo que implica que enzimas derivadas de un mismo gen medien funciones muy diversas (D. C. Love 2002).

Aunque tanto la identidad de la potencial isoforma mitocondrial de EXTL1 como su actividad se encuentran aún por determinar, existen precedentes en cuanto a la existencia de una glicosiltransferasa mitocondrial generada a partir de *splicing* alternativo. En ese caso el gen de interés codifica para una proteína mitocondrial y otra no mitocondrial, con funciones señalizadoras muy diferentes.

Conclusiones

- 1 El complejo I íntegro puede ser ensamblado en ausencia de complejo III, complejo IV o citocromo c, como demuestra la estabilización de complejo I obtenida por diferentes aproximaciones en células carentes de estos componentes de la cadena de transporte.
- 2 La inestabilidad de complejo I en células carentes de complejo III, complejo IV o citocromo c, es debida a un mecanismo de degradación mediado por transporte reverso de electrones, el cual es producido como consecuencia del acúmulo de coenzima Q reducida derivado del fallo en la cadena. El fenómeno concreto que parece iniciar esta degradación, es la oxidación de cisteínas críticas en las regiones NADH deshidrogenasa e hidrogenasa del complejo I, por daño oxidativo.
- 3 El mecanismo descrito para justificar la degradación de complejo I en células carentes de complejo III, complejo IV o citocromo c es extensible a situaciones fisiológicas. El incremento de la entrada de electrones, por vías diferentes a complejo I, activa el mecanismo de degradación aquí descrito, con el propósito de optimizar la entrada de electrones a la cadena liberando complejo III de su asociación con complejo I.
- 4 El tratamiento de cultivo celular con el inhibidor de flavoproteínas, difenilo iodonium produce degradación de complejo I de manera tiempo y dosis dependiente, por medio de la degradación del módulo NADH deshidrogenasa. Este compuesto puede ser una herramienta útil para el estudio de la fisiología mitocondrial, al permitirnos regular la cantidad de complejo I.
- 5 La caracterización del perfil de migración de todas las proteínas contenidas en geles BN-PAGE, a partir de mitocondrias de hígado, corazón, cerebro y líneas celulares control y deficientes en componentes de la mETC, permitió evaluar la interacción entre complejos respiratorios y proteínas mitocondriales. Se pudo identificar una proteína candidata para la interacción con complejo I, denominada EXTL1.
- 6 Experimentos preliminares parecen sugerir que no es EXTL1, sino una isoforma mitocondrial de esta proteína, la que interacciona con complejos respiratorios. La hipotética proteína mitocondrial presenta un perfil de migración totalmente coincidente con complejo III, por lo que la comigración con complejo I tan solo pudo ser confirmada a nivel de supercomplejos en que complejo I y complejo III interaccionan.

Bibliografía

- Abrahams JP, Leslie AGW, Lutter R and Walker JE (1994) Structure at 2.8 Å resolution of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* 370(6491): 621–628.
- Acín-Pérez R, Bayona-Bafaluy MP, Fernández-Silva P, Moreno-Loshuertos R, Pérez-Martos A, Bruno C, Moraes CT and Enríquez JA (2004) Respiratory complex III is required to maintain complex I in mammalian mitochondria. *Molecular Cell* 13(6): 805–815.
- Acin-Perez R, Carrascoso I, Baixauli F, Roche-Molina M, Latorre-Pellicer A, Fernandez-Silva P, Mittelbrunn M, Sanchez-Madrid F, Perez-Martos A, Lowell CA, Manfredi G and Enriquez JA (2014) ROS-triggered phosphorylation of complex II by Fgr kinase regulates cellular adaptation to fuel use. *Cell Metabolism* 19(6): 1020–1033.
- Acín-Pérez R, Fernández-Silva P, Peleato ML, Pérez-Martos A and Enriquez JA (2008) Respiratory Active Mitochondrial Supercomplexes. *Molecular Cell* 32(4): 529–539.
- Alcázar-Fabra M, Navas P and Brea-Calvo G (2016) Coenzyme Q biosynthesis and its role in the respiratory chain structure. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. Elsevier B.V. 1857(8): 1073–1078.
- Allen RD, Schroeder CC and Fok AK (1989) An investigation of mitochondrial inner membranes by rapid-freeze deep-etch techniques. *Journal of Cell Biology* 108(6): 2233–2240.
- Althoff T, Mills DJ, Popot J-L and Kühlbrandt W (2011) Arrangement of electron transport chain components in bovine mitochondrial supercomplex I₁III₂IV₁. *The EMBO journal* 30(22): 4652–64.
- Antoun G, McMurray F, Thrush AB, Patten DA, Peixoto AC, Slack RS, McPherson R, Dent R and Harper ME (2015) Impaired mitochondrial oxidative phosphorylation and supercomplex assembly in rectus abdominis muscle of diabetic obese individuals. *Diabetologia* 58(12): 2861–2866.
- Arnarez C, Marrink SJ and Periole X (2013) on Cytochrome C Oxidase At the Entrance. *Scientific reports* 3(1263): 1–8.
- Arnarez C, Mazat JP, Elezgaray J, Marrink SJ and Periole X (2013) Evidence for cardiolipin binding sites on the membrane-exposed surface of the cytochrome bc₁. *Journal of the American Chemical Society* 135(8): 3112–3120.
- Bachi A, Dalle-donne I and Scaloni A (2013) Redox Proteomics : Chemical Principles , Methodological Approaches and Biological / Biomedical Promises. *Chemical Reviews* 113(1): 596–698.
- Baracca A, Chiaradonna F, Sgarbi G, Solaini G, Alberghina L and Lenaz G (2010) Mitochondrial Complex I decrease is responsible for bioenergetic dysfunction in K-ras transformed cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. 1797(2): 314–323.
- Baradaran R, Berrisford JM, Minhas GS and Sazanov L a (2013) Crystal structure of the entire respiratory complex I. *Nature* 494(7438): 443–8.

- Becker T, Gebert M, Pfanner N and van der Laan M (2009) Biogenesis of mitochondrial membrane proteins. *Current Opinion in Cell Biology* 21(4): 484–493.
- Benard G, Bellance N, Jose C, Melser S, Nouette-Gaulain K and Rossignol R (2010) Multi-site control and regulation of mitochondrial energy production. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. 1797(6–7): 698–709.
- Benard G, Faustin B, Galinier A, Rocher C, Bellance N, Smolkova K, Casteilla L, Rossignol R and Letellier T (2008) Functional dynamic compartmentalization of respiratory chain intermediate substrates: Implications for the control of energy production and mitochondrial diseases. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 40(8): 1543–1554.
- Beutner G, Eliseev RA and Porter GA (2014) Initiation of electron transport chain activity in the embryonic heart coincides with the activation of mitochondrial complex I and the formation of supercomplexes. *PLoS ONE* 9(11): 1–25.
- Bianchi C, Genova ML, Castelli GP and Lenaz G (2004) The mitochondrial respiratory chain is partially organized in a supercomplex assembly: Kinetic evidence using flux control analysis. *Journal of Biological Chemistry* 279(35): 36562–36569.
- Birch-Machin MA and Turnbull DM (2001) Assaying mitochondrial respiratory complex activity in mitochondria isolated from human cells and tissues. *Methods in cell biology* 65: 97–117.
- Blaza JN, Serreli R, Jones AJY, Mohammed K and Hirst J (2014) Kinetic evidence against partitioning of the ubiquinone pool and the catalytic relevance of respiratory-chain supercomplexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(44): 15735–40.
- Bleier L, Wittig I, Heide H, Steger M, Brandt U and Dröse S (2015) Generator-specific targets of mitochondrial reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine*. Elsevier 78: 1–10.
- Boekema EJ and Braun H-P (2007) Supramolecular structure of the mitochondrial oxidative phosphorylation system. *The Journal of biological chemistry* 282(1): 1–4.
- Bohovych I, Fernandez MR, Rahn JJ, Stackley KD, Bestman JE, Anandhan A, Franco R, Claypool SM, Lewis RE, Chan SSL and Khalimonchuk O (2015) Metalloprotease OMA1 Fine-tunes Mitochondrial Bioenergetic Function and Respiratory Supercomplex Stability. *Scientific reports* 5: 13989.
- Bradford MM (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. 254: 248–254.
- Brand MD (2016) Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling. *Free Radical Biology and Medicine* 100: 14–31.

- Brea-Calvo G, Rodríguez-Hernández Á, Fernández-Ayala DJM, Navas P and Sánchez-Alcázar JA (2006) Chemotherapy induces an increase in coenzyme Q10 levels in cancer cell lines. *Free Radical Biology and Medicine* 40(8): 1293–1302.
- Brown GC and Borutaite V (2004) Inhibition of mitochondrial respiratory complex I by nitric oxide, peroxynitrite and S-nitrosothiols. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1658(1–2): 44–49.
- Budde SM, van den Heuvel LP, Janssen AJ, Smeets RJ, Buskens C a, DeMeirleir L, Van Coster R, Baethmann M, Voit T, Trijbels JM and Smeitink J a (2000) Combined enzymatic complex I and III deficiency associated with mutations in the nuclear encoded NDUF54 gene. *Biochemical and biophysical research communications* 275(1): 63–68.
- Bultema JB, Braun HP, Boekema EJ and Kouřil R (2009) Megacomplex organization of the oxidative phosphorylation system by structural analysis of respiratory supercomplexes from potato. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1787(1): 60–67.
- Burwell LS, Nadtochiy SM, Tompkins AJ, Young S and Brookes PS (2006) Direct evidence for S-nitrosation of mitochondrial complex I. *Biochemical Journal* 394(3): 627–634.
- Busse-Wicher M, Wicher KB and Kusche-Gullberg M (2014) The exostosin family: proteins with many functions. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 35: 25–33.
- Busse M, Feta a., Presto J, Wilen M, Gronning M, Kjellen L and Kusche-Gullberg M (2007) Contribution of EXT1, EXT2, and EXTL3 to Heparan Sulfate Chain Elongation. *Journal of Biological Chemistry* 282(45): 32802–32810.
- Calvaruso MA, Willems P, Van den brand M, Valsecchi F, Kruse S, Palmiter R, Smeitink J and Nijtmans L (2012) Mitochondrial complex III stabilizes complex I in the absence of NDUF54 to provide partial activity. *Human Molecular Genetics* 21(1): 115–120.
- Chaban Y, Boekema EJ and Dudkina N V. (2014) Structures of mitochondrial oxidative phosphorylation supercomplexes and mechanisms for their stabilisation. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. 1837(4): 418–426.
- Chance B, Williams G, Holmes W and Higgins J (1955) Respiratory Enzymes in Oxidative Phosphorylation. *J Biol Chem* 217: 409–428.
- Chance B and Williams GR (1955) A Method for the Localisation of Sites for Oxidative Phosphorylation. *Nature* 176: 250–254.
- Chatzi A, Manganas P and Tokatlidis K (2016) Oxidative folding in the mitochondrial intermembrane space: A regulated process important for cell physiology and disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1863(6): 1298–1306.

- Chen S, He Q and Greenberg ML (2008) Loss of tafazzin in yeast leads to increased oxidative stress during respiratory growth. *Molecular Microbiology* 68(4): 1061–1072.
- Chen Y, Azad MB and Gibson SB (2009) Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy. *Nature Publishing Group* 16(7): 1040–1052.
- Chen YC, Taylor EB, Dephoure N, Heo JM, Tonhato A, Papandreou I, Nath N, Denko NC, Gygi SP and Rutter J (2012) Identification of a protein mediating respiratory supercomplex stability. *Cell Metabolism*. 15(3): 348–360.
- Chinnery PF and Hudson G (2013) Mitochondrial genetics. *British Medical Bulletin* 106(1): 135–159.
- Chomyn A (1996) In vivo labeling and analysis of human mitochondrial translation products. *Methods in Enzymology* 264: 197–211.
- Chouchani ET, Pell VR, Gaude E, Aksentijević D, Sundier SY, Robb EL, Logan A, Nadtochiy SM, Ord ENJ, Smith AC, Eyassu F, Shirley R, Hu C-H, Dare AJ, James AM, Rogatti S, Hartley RC, Eaton S, Costa ASH, Brookes PS, Davidson SM, Duchon MR, Saeb-Parsy K, Shattock MJ, Robinson AJ, Work LM, Frezza C, Krieg T and Murphy MP (2014) Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature* 515(V): 431–435.
- Chouchani ET, Pell VR, James AM, Work LM, Saeb-Parsy K, Frezza C, Krieg T and Murphy MP (2016) A Unifying Mechanism for Mitochondrial Superoxide Production during Ischemia-Reperfusion Injury. *Cell Metabolism*. 23(2): 254–263.
- Civiletto G, Varanita T, Scorrano L, Zeviani M, Civiletto G, Varanita T, Cerutti R, Gorletta T, Barbaro S and Marchet S (2015) Opa1 Overexpression Ameliorates the Phenotype of Two Mitochondrial Disease Mouse Models Article Opa1 Overexpression Ameliorates the Phenotype of Two Mitochondrial Disease Mouse Models. *Cell Metabolism* 21(6): 845–854.
- Cogliati S, Calvo E, Loureiro M, Guaras AM, Nieto-Arellano R, Garcia-Poyatos C, Ezkurdia I, Mercader N, Vázquez J and Enriquez JA (2016) Mechanism of super-assembly of respiratory complexes III and IV. *Nature* 539(7630): 579–582.
- Cogliati S, Enriquez JA and Scorrano L (2016) Mitochondrial Cristae: Where Beauty Meets Functionality. *Trends in Biochemical Sciences* 41(3): 261–273.
- Cogliati S, Frezza C, Soriano ME, Varanita T, Quintana-Cabrera R, Corrado M, Cipolat S, Costa V, Casarin A, Gomes LC, Perales-Clemente E, Salviati L, Fernandez-Silva P, Enriquez JA and Scorrano L (2013) Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency. *Cell* 155(1): 160–171.
- Cross AR and Jones OT (1986) The effect of the inhibitor diphenylene iodonium on the superoxide-generating system of neutrophils. Specific labelling of a component polypeptide of the oxidase. *The Biochemical journal* 237(1): 111–116.

- D'Aurelio M, Gajewski CD, Lenaz G and Manfredi G (2006) Respiratory chain supercomplexes set the threshold for respiration defects in human mtDNA mutant cybrids. *Human Molecular Genetics* 15(13): 2157–2169.
- Dalmonte ME, Forte E, Genova ML, Giuffrè A, Sarti P and Lenaz G (2009) Control of Respiration by Cytochrome c Oxidase in Intact Cells. 284(47): 32331–32335.
- Dassa EP, Dufour E, Paupe V, Hakkaart GAJ, Jacobs HT and Rustin P (2009) Expression of the alternative oxidase complements cytochrome c oxidase deficiency in human cells. *EMBO Molecular Medicine* 1: 30–36.
- Davies KM, Strauss M, Daum B, Kief JH, Osiewacz HD, Rycovska A, Zickermann V and Kuhlbrandt W (2011) Macromolecular organization of ATP synthase and complex I in whole mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(34): 14121–14126.
- Desmurs M, Foti M, Raemy E, Vaz FM, Martinou J-C, Bairoch A and Lane L (2015) C11orf83, a mitochondrial cardiolipin-binding protein involved in bc1 complex assembly and supercomplex stabilization. *Molecular and cellular biology* 35(7): 1139–56.
- Detmer SA and Chan DC (2007) Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(11): 870–879.
- Díaz F, Enríquez JA and Moraes CT (2012) Cells lacking Rieske iron-sulfur protein have a reactive oxygen species-associated decrease in respiratory complexes I and IV. *Molecular and cellular biology* 32(2): 415–29.
- Díaz F, Fukui H, García S and Moraes CT (2006) Cytochrome c oxidase is required for the assembly/stability of respiratory complex I in mouse fibroblasts. *Molecular and cellular biology* 26(13): 4872–4881.
- Dieteren CEJ, Koopman WJH, Swarts HG, Peters JGP, Maczuga P, Van Gemst JJ, Masereeuw R, Smeitink JAM, Nijtmans LGJ and Willems PHGM (2012) Subunit-specific incorporation efficiency and kinetics in mitochondrial complex I homeostasis. *Journal of Biological Chemistry* 287(50): 41851–41860.
- Dröse S, Stepanova A and Galkin A (2016) Ischemic A/D transition of mitochondrial complex I and its role in ROS generation. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1857(7): 946–957.
- Duarte M and Videira A (2009) Effects of mitochondrial complex III disruption in the respiratory chain of *Neurospora crassa*. *Molecular Microbiology* 72(1): 246–258.
- Dudkina N V, Eubel H, Keegstra W, Boekema EJ and Braun H-P (2005) Structure of a mitochondrial supercomplex formed by respiratory-chain complexes I and III. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(9): 3225–9.

- Dudkina N V, Kudryashev M, Stahlberg H and Boekema EJ (2011) Interaction of complexes I, III, and IV within the bovine respirasome by single particle cryoelectron tomography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(37): 15196–200.
- El-khoury R, Dufour E, Rak M, Ramanantsoa N, Grandchamp N, Gallego J, Gressens P, Sarkis C, Rustin P and Jacobs HT (2013) Alternative Oxidase Expression in the Mouse Enables Bypassing Cytochrome c Oxidase Blockade and Limits. *PLoS Genetics* 9(1): 1–11.
- Enerbäck S, Jacobsson A, Simpson EM, Guerra C, Yamashita H, Harper ME and Kozak LP (1997) Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. *Nature*, 90–94.
- Enríquez JA (2016) Supramolecular Organization of Respiratory Complexes. *Annual review of physiology* 78(533–61).
- Estornell E, Fato R, Castelluccio C, Cavazzoni M, Castelli GP and Lenaz G (1992) Saturation kinetics of coenzyme Q in NADH and succinate oxidation in beef heart mitochondria. *FEBS Letters* 311(2): 107–109.
- Eubel H, Heinemeyer J and Braun H (2004) Identification and Characterization of Respirasomes in Potato mitochondria. *Plant Physiology* 134(April): 1450–1459.
- Eubel H, Jansch L and Braun H (2003) New Insights into the Respiratory Chain of Plant Mitochondria. Supercomplexes and a Unique Composition of Complex II. *Plant Physiology* 133: 274–286.
- Fato R, Bergamini C, Bortolus M, Maniero AL, Leoni S, Ohnishi T and Lenaz G (2010) Differential effects of mitochondrial Complex I inhibitors on production of reactive oxygen species. *Biochimica et biophysica acta* 1787(5): 384–392.
- Fernandez-Vizarra E, Bugiani M, Goffrini P, Carrara F, Farina L, Procopio E, Donati A, Uziel G, Ferrero I and Zeviani M (2007) Impaired complex III assembly associated with BCS1L gene mutations in isolated mitochondrial encephalopathy. *Human Molecular Genetics* 16(10): 1241–1252.
- Fernández-Vizarra E, Ferrín G, Pérez-Martos A, Fernández-Silva P, Zeviani M and Enríquez JA (2010) Isolation of mitochondria for biogenetical studies: An update. *Mitochondrion*. Mitochondria Research Society 10(3): 253–262.
- Fiedorczuk K, Letts JA, Degliesposti G, Kaszuba K, Skehel M and Sazanov LA (2016) Atomic structure of the entire mammalian mitochondrial complex I. *Nature*. Nature Publishing Group 538: 406–410.
- Frenzel M, Rommelspacher H, Sugawa MD and Dencher NA (2010) Ageing alters the supramolecular architecture of OxPhos complexes in rat brain cortex. *Experimental Gerontology* 45(7–8): 563–572.

- Frey TG and Mannella CA (2017) The internal structure of mitochondria. *Trends in Biochemical Sciences* 25(7): 319–324.
- Fry M and Green DE (1980) Energized cation transport by Complex III (ubiquinone-cytochrome c reductase. *Biochem Biophys Res Commun* 97(3): 852–859.
- Fry M and Green DE (1981) Cardiolipin Requirement for Electron Transfer in Complex I and IT1 of the Mitochondrial Respiratory Chain. *The journal of biological chemistry* 256(4): 1874–1880.
- Galkin A, Abramov AY, Frakich N, Duchen MR and Moncada S (2009) Lack of oxygen deactivates mitochondrial complex I: Implications for ischemic injury? *Journal of Biological Chemistry* 284(52): 36055–36061.
- Galkin A, Meyer B, Wittig I, Karas M, Schägger H, Vinogradov A and Brandt U (2008) Identification of the mitochondrial ND3 subunit as a structural component involved in the active/deactive enzyme transition of respiratory complex I. *Journal of Biological Chemistry* 283(30): 20907–20913.
- Garaude J, Acín-Pérez R, Martínez-Cano S, Enamorado M, Ugolini M, Nistal-Villán E, Hervás-Stubbs S, Pelegrín P, Sander LE, Enríquez JA and Sancho D (2016) Mitochondrial respiratory-chain adaptations in macrophages contribute to antibacterial host defense. *Nature Immunology* 17(9): 1037–1045.
- Garlich J, Strecker V, Wittig I and Stuart RA (2017) Mutational Analysis of the QRRQ Motif in the Yeast Hig1-type 2 Protein, Rcf1, Reveals a Regulatory Role for the Cytochrome c Oxidase Complex. *Journal of Biological Chemistry* jbc.M116.758045.
- Genova ML and Lenaz G (2013) A critical appraisal of the role of respiratory supercomplexes in mitochondria. *Biological Chemistry* 394(5): 631–639.
- Gohil VM, Hayes P, Matsuyama S, Schägger H, Schlame M and Greenberg ML (2004) Cardiolipin biosynthesis and mitochondrial respiratory chain function are interdependent. *Journal of Biological Chemistry* 279(41): 42612–42618.
- Gomes LC, Di Benedetto G and Scorrano L (2011) During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nature cell biology* 13(5): 589–98.
- Gómez LA and Hagen TM (2012) Age-related decline in mitochondrial bioenergetics: Does supercomplex destabilization determine lower oxidative capacity and higher superoxide production? *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 23(7): 758–767.
- Gómez LA, Monette JS, Chavez JD, Maier CS and Hagen TM (2009) Supercomplexes of the mitochondrial electron transport chain decline in the aging rat heart. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 490(1): 30–35.
- Gonzalvez F, D'Aurelio M, Boutant M, Moustapha A, Puech JP, Landes T, Arnaun-Pelloquin L, Vial G, Taleux N, Slomianny C, Wanders RJ, Houtkooper RH, Bellenguer P, Müller IM, Gottlieb E, Vaz FM, Manfredi G and Petit PX (2013) Barth syndrome:

Cellular compensation of mitochondrial dysfunction and apoptosis inhibition due to changes in cardiolipin remodeling linked to tafazzin (TAZ) gene mutation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1832(8): 1194–1206.

Gray MW (2012) Mitochondrial Evolution. *Cold Spring Harbor Perspectives in biology* 94(9).

Gray MW, Lang BF and Burger G (2004) Mitochondria of Protists. *Annual Review of Genetics* 38(1): 477–524.

Green DE and Tzagoloff A (1966) The mitochondrial electron transfer chain. *Archives of biochemistry and biophysics* 116(1): 293–304.

Greggio C, Jha P, Kulkarni SS, Lagarrigue S, Broskey NT, Boutant M, Wang X, Conde Alonso S, Ofori E, Auwerx J, Cantó C and Amati F (2016) Enhanced Respiratory Chain Supercomplex Formation in Response to Exercise in Human Skeletal Muscle. *Cell Metabolism* 1–11.

Gu J, Wu M, Guo R, Yan K, Lei J, Gao N and Yang M (2016) The architecture of the mammalian respirasome. *Nature* 537(7622): 1–16.

Guarás A, Perales-Clemente E, Calvo E, Acín-Pérez R, Loureiro-Lopez M, Pujol C, Martínez-Carrascoso I, Nuñez E, García-Marqués F, Rodríguez-Hernández MA, Cortés A, Diaz F, Pérez-Martos A, Moraes CT, Fernández-Silva P, Trifunovic A, Navas P, Vazquez J and Enríquez JA (2016) The CoQH₂/CoQ Ratio Serves as a Sensor of Respiratory Chain Efficiency. *Cell Reports* 15(1): 197–209.

Guerrero-Castillo S, Baertling F, Kownatzki D, Wessels HJ, Arnold S, Brandt U and Nijtmans L (2016) The Assembly Pathway of Mitochondrial Respiratory Chain Complex I. *Cell Metabolism*. pages 1–12.

Guerrero-Castillo S, Vázquez-Acevedo M, González-Halphen D and Uribe-Carvajal S (2009) In *Yarrowia lipolytica* mitochondria, the alternative NADH dehydrogenase interacts specifically with the cytochrome complexes of the classic respiratory pathway. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1787(2): 75–85.

Gupte S, Wu ES, Hoehli L, Hoehli M, Jacobson K, Sowers a E and Hackenbrock CR (1984) Relationship between lateral diffusion, collision frequency, and electron transfer of mitochondrial inner membrane oxidation-reduction components. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81(9): 2606–10.

Hackenbrock CR, Chazotte B and Gupte SS (1986) The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 18(5): 331–368.

Hackenbrock CR, Höchli M and Chau RM (1976) Calorimetric and freeze fracture analysis of lipid phase transitions and lateral translational motion of intramembrane particles in mitochondrial membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 455(2): 466–484.

- Hackstein JHP, Tjaden J and Huynen M (2006) Mitochondria, hydrogenosomes and mitosomes: Products of evolutionary tinkering! *Current Genetics* 50(4): 225–245.
- Hakkaart GAJ, Dassa EP, Jacobs HT and Rustin P (2006) Allotopic expression of a mitochondrial alternative oxidase confers cyanide resistance to human cell respiration. *EMBO reports* 7(3): 4–8.
- Hancock JT and Jones OT (1987) The inhibition by diphenyliodonium and its analogues of superoxide generation by macrophages. *The Biochemical journal* 242(1): 103–107.
- Hatefi Y, Haavik AG, Fowler LR and Griffiths D (1962) Studies on the Electron Transfer System XLII. Reconstitution of the electron transfer system. *The Journal of biological chemistry* 237(8).
- Hatle KM, Gummadidala P, Navasa N, Bernardo E, Dodge J, Silverstrim B, Fortner K, Burg E, Suratt BT, Hammer J, Radermacher M, Taatjes DJ, Thornton T, Anguita J and Rincon M (2013) MCJ/DnaJC15, an endogenous mitochondrial repressor of the respiratory chain that controls metabolic alterations. *Molecular and cellular biology* 33(11): 2302–2314.
- Heide H, Bleier L, Steger M, Ackermann J, Dröse S, Schwamb B, Zörnig M, Reichert AS, Koch I, Wittig I and Brandt U (2012) Complexome profiling identifies TMEM126B as a component of the mitochondrial complex I assembly complex. *Cell Metabolism* 16(4): 538–549.
- Helbig AO, De Groot MJL, Van Gestel RA, Mohammed S, De Hulster EAF, Luttik MAH, Daran-Lapujade P, Pronk JT, Heck AJR and Slijper M (2009) A three-way proteomics strategy allows differential analysis of yeast mitochondrial membrane protein complexes under anaerobic and aerobic conditions. *Proteomics* 9(20): 4787–4798.
- Hernansanz-Agustín P, Izquierdo-Álvarez A, Sánchez-Gómez FJ, Ramos E, Villa-Piña T, Lamas S, Bogdanova A and Martínez-Ruiz A (2014) Acute hypoxia produces a superoxide burst in cells. *Free Radical Biology and Medicine* 71: 146–156.
- Hirst J, King MS and Pryde KR (2008) The production of reactive oxygen species by complex I. *Biochemical Society transactions* 36(Pt 5): 976–980.
- Höchli M and Hackenbrock CR (1979) Lateral translational diffusion of cytochrome c oxidase in the mitochondrial energy-transducing membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76(3): 1236–40.
- Hofhaus G and Attardi G (1995) Efficient selection and characterization of mutants of a human cell line which are defective in mitochondrial DNA-encoded subunits of respiratory NADH dehydrogenase. *Molecular and cellular biology* 15(2): 964–74.
- Hofhaus G, Shakeley RM and Attardi G (1996) Use of Polarography to Detect Respiration Defects in Cell Cultures. *Methods in Enzymology* 264: 476–483.

- Hofmann AD, Beyer M, Krause-Buchholz U, Wobus M, Bornhäuser M and Rödel G (2012) Oxphos supercomplexes as a hallmark of the mitochondrial phenotype of adipogenic differentiated human MSCs. *PLoS ONE* 7(4).
- Holmström KM and Finkel T (2014) Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nature* 515(7469): 411–421.
- Jiang F, Ryan MT, Schlame M, Zhao M, Gu Z, Klingenberg M, Pfanner N and Greenberg ML (2000) Absence of cardiolipin in the *crd1* null mutant results in decreased mitochondrial membrane potential and reduced mitochondrial function. *Journal of Biological Chemistry* 275(29): 22387–22394.
- Keilin D and Hartree EF (1947) Activity of the cytochrome system in heart muscle preparations. *Biochemical Journal* 41(4): 500–502.
- Kemppainen KK, Rinne J, Sriram A, Lakanmaa M, Zeb A, Tuomela T, Popplestone A, Singh S, Sanz A, Rustin P and Jacobs HT (2014) Expression of alternative oxidase in *Drosophila* ameliorates diverse phenotypes due to cytochrome oxidase deficiency. *Human Molecular Genetics* 23(8): 2078–2093.
- Khacho M, Tarabay M, Patten D, Khacho P, Maclaurin JG, Guadagno J, Bergeron R, Cregan SP, Harper M, Park DS and Slack RS (2014) Acidosis overrides oxygen deprivation to maintain mitochondrial function and cell survival. *Nature Communications* 5: 1–15.
- Kim BT, Kitagawa H, Tamura J, Saito T, Kusche-Gullberg M, Lindahl U and Sugahara K (2001) Human tumor suppressor EXT gene family members EXTL1 and EXTL3 encode alpha 1,4- N-acetylglucosaminyltransferases that likely are involved in heparan sulfate/ heparin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(13): 7176–7181.
- Koh MY and Powis G (2012) Passing the baton: The HIF switch. *Trends in Biochemical Sciences* 37(9): 364–372.
- Krause F, Reifschneider NH, Vocke D, Seelert H, Rexroth S and Dencher NA (2004) ‘Respirasome’-like supercomplexes in green leaf mitochondria of spinach. *Journal of Biological Chemistry* 279(46): 48369–48375.
- Krause F, Scheckhuber CQ, Werner A, Rexroth S, Reifschneider NH, Dencher NA and Osiewacz HD (2004) Supramolecular organization of cytochrome c oxidase- and alternative oxidase-dependent respiratory chains in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Journal of Biological Chemistry* 279(25): 26453–26461.
- Kröger A and Klingenberg M (1973) The Kinetics of the Redox Reactions of Ubiquinone Related to the ElectronTransport Activity in the Respiratory Chain. *European Journal of Biochemistry* 34(2): 358–368.
- Kunji ERS, Aleksandrova A, King MS, Majd H, Ashton VL, Cerson E, Springett R, Kibalchenko M, Tavoulari S, Crichton PG and Ruprecht JJ (2016) The transport mechanism of the mitochondrial ADP/ATP carrier. *Biochimica et Biophysica Acta* -

Molecular Cell Research 1863(10): 2379–2393.

Lacza Z, Pankotai E and Busija DW (2015) Mitochondrial nitric oxide synthase: current concepts and controversies. *Frontiers in bioscience* 14: 4436–4443.

Lagendijk J, Ubbink JB and Vermaak WJ (1996) Measurement of the ratio between the reduced and oxidized forms of coenzyme Q10 in human plasma as a possible marker of oxidative stress. *Journal of lipid research* 37(1): 67–75.

Lamantea E, Carrara F, Mariotti C, Morandi L, Tiranti V and Zeviani M (2002) A novel nonsense mutation (Q352X) in the mitochondrial cytochrome b gene associated with a combined deficiency of complexes I and III. *Neuromuscular Disorders* 12(1): 49–52.

Lambert AJ and Brand MD (2004) Inhibitors of the Quinone-binding Site Allow Rapid Superoxide Production from Mitochondrial NADH: Ubiquinone Oxidoreductase (Complex I)*. 279(38): 39414–39420.

Lambert AJ, Buckingham J a., Boysen HM and Brand MD (2008) Diphenyleneiodonium acutely inhibits reactive oxygen species production by mitochondrial complex I during reverse, but not forward electron transport. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1777(5): 397–403.

Lapiente-Brun E, Moreno-Loshuertos R, Acín-Pérez R, Latorre-Pellicer A, Colás C, Balsa E, Perales-Clemente E, Quirós PM, Calvo E, Rodríguez-Hernández M a, Navas P, Cruz R, Carracedo Á, López-Otín C, Pérez-Martos A, Fernández-Silva P, Fernández-Vizarra E and Enríquez JA (2013) Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain. *Science* 340(6140): 1567–70.

Lardy A (1973) Mechanism of Action of the Hypoglycemic Agent Diphenyleneiodonium *. 248(17): 6050–6056.

Lass A and Sohal RS (1999) Comparisons of coenzyme Q bound to mitochondrial membrane proteins among different mammalian species. *Free radical biology & medicine* 27(1–2): 220–6.

Lazarou M, McKenzie M, Ohtake A, Thorburn DR and Ryan MT (2007) Analysis of the assembly profiles for mitochondrial- and nuclear-DNA-encoded subunits into complex I. *Molecular and cellular biology* 27(12): 4228–4237.

Lenaz G and Fato R (1986) Is ubiquinone diffusion rate-limiting for electron transfer? *Journal of bioenergetics and biomembranes* 18(5): 369–401.

Lenaz G and Genova ML (2007) Kinetics of integrated electron transfer in the mitochondrial respiratory chain: random collisions vs. solid state electron channeling. *American journal of physiology. Cell physiology* 292(4): C1221–39.

Letts JA, Fiedorczuk K and Sazanov LA (2016) The architecture of respiratory supercomplexes. *Nature* 537(7622): 644–648.

- Liesa M and Shirihai OS (2013) Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. *Cell Metabolism* 17(4): 491–506.
- Liu Y, Fiskum G and Schubert D (2002) Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem* 80(5): 780–787.
- Lopez-Fabuel I, Le Douce J, Logan A, James AM, Bonvento G, Murphy MP, Almeida A and Bolaños JP (2016) Complex I assembly into supercomplexes determines differential mitochondrial ROS production in neurons and astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113(46): 13063–13068.
- López-Ferrer D, Ramos-Fernández A, Martínez-Bartolomé S, García-Ruiz P and Vázquez J (2006) Quantitative proteomics using $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ labeling and linear ion trap mass spectrometry. *Proteomics* 6(S1): S4--S11.
- Love DC (2002) Mitochondrial and nucleocytoplasmic targeting of O-linked GlcNAc transferase. *Journal of Cell Science* 116(4): 647–654.
- Love DC and Hanover J a (2005) The hexosamine signaling pathway: deciphering the ‘O-GlcNAc code’. *Science’s STKE* 2005(312): 1–14.
- Maas MFPM, Krause F, Dencher NA and Sainsard-Chanet A (2009) Respiratory Complexes III and IV Are Not Essential for the Assembly/Stability of Complex I in Fungi. *Journal of Molecular Biology* 387(2): 259–269.
- Majander A, Finel M and Wikström M (1994) Diphenyliodonium inhibits reduction of iron-sulfur clusters in the mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase (Complex I). *Journal of Biological Chemistry* 269(33): 21037–21042.
- Maranzana E, Barbero G, Falasca AI, Lenaz G and Genova ML (2013) Mitochondrial respiratory supercomplex association limits production of reactive oxygen species from complex I. *Antioxidants & redox signaling* 19(13): 1469–80.
- Marques I, Dencher NA, Videira A and Krause F (2007) Supramolecular organization of the respiratory chain in *Neurospora crassa* mitochondria. *Eukaryotic Cell* 6(12): 2391–2405.
- Martinez-Acedo P, Nunez E, Gomez FJS, Moreno M, Ramos E, Izquierdo-Alvarez A, Miro-Casas E, Mesa R, Rodriguez P, Martinez-Ruiz A, Dorado DG, Lamas S and Vazquez J (2012) A Novel Strategy for Global Analysis of the Dynamic Thiol Redox Proteome. *Molecular & cellular proteomics* 11(9): 800–13.
- McCormick C, Duncan G, Goutsos KT and Tufaro F (2000) The putative tumor suppressors EXT1 and EXT2 form a stable complex that accumulates in the Golgi apparatus and catalyzes the synthesis of heparan sulfate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(2): 668–673.

- McDonald AE, Vanlerberghe GC and Staples JF (2009) Alternative oxidase in animals : unique characteristics and taxonomic distribution. *The Journal of Experimental Biology* 212: 2627–2634.
- McKenzie M, Lazarou M, Thorburn DR and Ryan MT (2006) Mitochondrial Respiratory Chain Supercomplexes Are Destabilized in Barth Syndrome Patients. *Journal of Molecular Biology* 361(3): 462–469.
- Mileykovskaya E, Penczek PA, Fang J, Mallampalli VKPS, Sparagna GC and Dowhan W (2012) Arrangement of the respiratory chain complexes in *Saccharomyces cerevisiae* supercomplex III₂IV₂ revealed by single particle cryo-electron microscopy. *Journal of Biological Chemistry* 287(27): 23095–23103.
- Millar AH, Day DA, Millar AH and Day DA (1997) Nitric oxide inhibits the cytochrome oxidase but not the alternative oxidase of plant mitochondria Nitric oxide inhibits the cytochrome oxidase but not the alternative oxidase of plant mitochondria. *FEBS Journal* 398: 155–158.
- Mills EL, Kelly B, Logan A, Costa ASH, Varma M, Bryant CE, Tzourlomos P, Däbritz JHM, Gottlieb E, Latorre I, Corr SC, McManus G, Ryan D, Jacobs HT, Szibor M, Xavier RJ, Braun T, Frezza C, Murphy MP and O'Neill LA (2016) Succinate Dehydrogenase Supports Metabolic Repurposing of Mitochondria to Drive Inflammatory Macrophages. *Cell* 167(2): 457–470.e13.
- Mitchell P (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191: 144–48.
- Mitra K, Wunder C, Roysam B, Lin G and Lippincott-Schwartz J (2009) A hyperfused mitochondrial state achieved at G1-S regulates cyclin E buildup and entry into S phase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(29): 11960–5.
- Molina AJA, Wikstrom JD, Stiles L, Las G, Mohamed H, Elorza A, Walzer G, Twig G, Katz S, Corkey BE and Shirihai OS (2009) Mitochondrial networking protects beta-cells from nutrient-induced apoptosis. *Diabetes* 58(10): 2303–2315.
- Morán M, Marín-Buera L, Gil-Borlado MC, Rivera H, Blázquez A, Seneca S, Vázquez-López M, Arenas J, Martín MA and Ugalde C (2010) Cellular pathophysiological consequences of BCS1L mutations in mitochondrial complex III enzyme deficiency. *Human Mutation* 31(8): 930–941.
- Moreno-Lastres D, Fontanesi F, García-Consuegra I, Martín MA, Arenas J, Barrientos A and Ugalde C (2012) Mitochondrial complex I plays an essential role in human respirasome assembly. *Cell Metabolism* 15(3): 324–335.
- Moreno-Loshuertos R, Acín-Pérez R, Fernández-Silva P, Movilla N, Pérez-Martos A, Rodríguez de Córdoba S, Gallardo ME, Enríquez JA, Acín-Pérez R, Fernández-Silva P, Movilla N, Pérez-Martos A, de Córdoba SR, Gallardo ME and Enríquez JA (2006) Differences in reactive oxygen species production explain the phenotypes associated with common mouse mitochondrial DNA variants. *Nature Genetics* 38(11): 1261–1268.

- Müller CS, Bildl W, Haupt A, Ellenrieder L, Becker T, Hunte C, Fakler B and Schulte U (2016) Cryo-slicing Blue Native-Mass Spectrometry (csBN-MS), a Novel Technology for High Resolution Complexome Profiling. *Molecular & Cellular Proteomics* 15(2): 669–681.
- Murphy MP (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal* 417(1): 1–13.
- Murphy MP, Holmgren A, Larsson N, Halliwell B, Chang J, Kalyanaraman B, Rhee SG, Thornalley PJ, Gems D, Nyström T, Belousov V and Schumacker PT (2015) Unravelling the Biological Roles of Reactive Oxygen Species Michael. 13(4): 361–366.
- Nagel S, Hadley G, Pfleger K, Grond-Ginsbach C, Buchan AM, Wagner S and Papadakis M (2012) Suppression of the inflammatory response by diphenyleneiodonium after transient focal cerebral ischemia. *Journal of Neurochemistry* 123(SUPPL. 2): 98–107.
- Nath AK, Riu JH, Jin YN, Roberts LD, Dejam A, Gerszten RE and Peterson RT (2015) PTPMT1 inhibition lowers glucose through succinate dehydrogenase phosphorylation. *Cell reports* 10: 694–701.
- Neupert W and Herrmann JM (2007) Translocation of Proteins into Mitochondria. *Annual Review of Biochemistry* 76(1): 723–749.
- Nübel E, Wittig I, Kerscher S, Brandt U and Schägger H (2009) Two-dimensional native electrophoretic analysis of respiratory supercomplexes from *Yarrowia lipolytica*. *Proteomics* 9(9): 2408–18.
- Okun JG, Lümmen P and Brandt U (1999) Three classes of inhibitors share a common binding domain in mitochondrial complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase). *The Journal of biological chemistry* 274(5): 2625–30.
- Otera H, Miyata N, Kuge O and Mihara K (2016) Drp1-dependent mitochondrial fission via MiD49/51 is essential for apoptotic cristae remodeling. *Journal of Cell Biology* 212(5): 531–544.
- Pagliarini DJ, Calvo SE, Chang B, Sheth SA, Vafai SB, Ong SE, Walford GA, Sugiana C, Boneh A, Chen WK, Hill DE, Vidal M, Evans JG, Thorburn DR, Carr SA and Mootha VK (2008) A Mitochondrial Protein Compendium Elucidates Complex I Disease Biology. *Cell* 134(1): 112–123.
- Panov A, Dikalov S, Shalbuyeva N, Hemendinger R, Greenamyre JT and Rosenfeld J (2007) Species- and tissue-specific relationships between mitochondrial permeability transition and generation of ROS in brain and liver mitochondria of rats and mice. *American journal of physiology. Cell physiology* 292(2): C708--18.
- Pennisi R, Salvi D, Brandi V, Angelini R, Ascenzi P and Polticelli F (2016) Molecular Evolution of Alternative Oxidase Proteins: A Phylogenetic and Structure Modeling Approach. *Journal of Molecular Evolution* 82(4): 207–218.

- Perales-Clemente E, Bayona-Bafaluy MP, Pérez-Martos A, Barrientos A, Fernández-Silva P and Enriquez JA (2008) Restoration of electron transport without proton pumping in mammalian mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(48): 18735–9.
- Perales-Clemente E, Fernández-Vizarra E, Acín-Pérez R, Movilla N, Bayona-Bafaluy MP, Moreno-Loshuertos R, Pérez-Martos A, Fernández-Silva P and Enriquez JA (2010) Five entry points of the mitochondrially encoded subunits in mammalian complex I assembly. *Molecular and cellular biology* 30(12): 3038–3047.
- Perez-Perez R, Lobo-Jarne T, Milenkovic D, Mourier A, Bratic A, García-Bartolome A, Fernandez-Vizarra E, Cadenas S, Delmiro A, Garcia-Consuegra I, Arenas J, Martin MA, Larsson N and Ugalde C (2016) COX7A2L Is a Mitochondrial Complex III Binding Protein that Stabilizes the III2+IV Supercomplex without Affecting Respirasome Formation. *Cell Reports* 16(9): 2387–2398.
- Pfeiffer K, Gohil V, Stuart RA, Hunte C, Brandt U, Greenberg ML and Schägger H (2003) Cardiolipin Stabilizes Respiratory Chain Supercomplexes. *Journal of Biological Chemistry* 278(52): 52873–52880.
- Piccoli C, Scrima R, Boffoli D and Capitanio N (2006) Control by cytochrome c oxidase of the cellular oxidative phosphorylation system depends on the mitochondrial energy state. *Biochemical Journal* 396(3): 573.
- Porras CA-M and Bai Y (2015) Respiratory supercomplexes: plasticity and implications. *Frontiers in bioscience* 20: 621–34.
- Prasad R, Kappes JC KS (2016) Inhibition of NADPH oxidase 1 activity and blocking the binding of cytosolic and membrane-bound proteins by honokiol inhibit migratory potential of melanoma cells. *Oncotarget* 7(7): 7899–7912.
- Pryde KR and Hirst J (2011) Superoxide is produced by the reduced flavin in mitochondrial complex I: A single, unified mechanism that applies during both forward and reverse electron transfer. *Journal of Biological Chemistry* 286(20): 18056–18065.
- Pujol C, Bratic-Hench I, Sumakovic M, Hench J, Mourier A, Baumann L, Pavlenko V and Trifunovic A (2013) Succinate Dehydrogenase Upregulation Destabilize Complex I and Limits the Lifespan of gas-1 Mutant. *PLoS ONE* 8(3).
- Quarato G, Piccoli C, Scrima R and Capitanio N (2011) Variation of flux control coefficient of cytochrome c oxidase and of the other respiratory chain complexes at different values of protonmotive force occurs by a threshold mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1807(9): 1114–1124.
- Ragan CI and Bloxham DP (1977) Specific labelling of a constituent polypeptide of bovine heart mitochondrial reduced nicotinamide-adenine dinucleotide-ubiquinone reductase by the inhibitor diphenyleneiodonium. *Biochem J* 163(3): 605–615.

- Ramos-Fernandez A, Lopez-Ferrer D and Vazquez J (2007) Improved Method for Differential Expression Proteomics Using Trypsin-catalyzed ^{18}O Labeling with a Correction for Labeling Efficiency. *Molecular & Cellular Proteomics* 6(7): 1274–1286.
- Rigoulet M, Yoboue ED and Devin A (2011) Mitochondrial ROS Generation and Its Regulation : Mechanisms Involved in H_2O_2 Signaling. 14(3): 459–468.
- Rodríguez-Arribas M, Yakhine-Diop SMS, Pedro JMBS, Gómez-Suaga P, Gómez-Sánchez R, Martínez-Chacón G, Fuentes JM, González-Polo RA and Niso-Santano M (2016) Mitochondria-Associated Membranes (MAMs): Overview and Its Role in Parkinson's Disease. *Molecular Neurobiology*. Molecular Neurobiology 1–17. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-016-0140-8>.
- Rohlenova K, Sachaphibulkij K, Stursa J, Bezawork-Geleta A, Blecha J, Endaya B, Werner L, Cerny J, Zabalova R, Goodwin J, Spacek T, Alizadeh Pesdar E, Yan B, Nguyen MN, Vondrusova M, Sobol M, Jezek P, Hozak P, Truksa J, Rohlena J, Dong L-F and Neuzil J (2017) Selective Disruption of Respiratory Supercomplexes as a New Strategy to Suppress Her2^{high} Breast Cancer. *Antioxidants & Redox Signaling* 26(2): 84–103.
- Rosca M, Minkler P and Hoppel CL (2011) Cardiac mitochondria in heart failure: Normal cardiolipin profile and increased threonine phosphorylation of complex IV. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. Elsevier B.V. 11.02.003.
- Rosca MG, Vazquez EJ, Kerner J, Parland W, Chandler MP, Stanley W, Sabbah HN and Hoppel CL (2008) Cardiac mitochondria in heart failure: Decrease in respirasomes and oxidative phosphorylation. *Cardiovascular Research* 80(1): 30–39.
- Rydström J (2006) Mitochondrial NADPH, transhydrogenase and disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1757(5–6): 721–726.
- Saada A, Edvardson S, Shaag A, Chung WK, Segel R, Miller C, Jalas C and Elpeleg O (2012) Combined OXPHOS complex i and IV defect, due to mutated complex I assembly factor C20ORF7. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 35(1): 125–131.
- Santo-Domingo J and Demaurex N (2010) Calcium uptake mechanisms of mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. Elsevier B.V. 1797(6–7): 907–912.
- Sazanov L a. (2015) A giant molecular proton pump: structure and mechanism of respiratory complex I. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 16(6): 375–388.
- Sazanov LA, Baradaran R, Efremov RG, Berrisford JM and Minhas G (2013) A long road towards the structure of respiratory complex I, a giant molecular proton pump. *Biochemical Society Transactions* 41(5): 1265–1271.
- Schäfer E, Seelert H, Reifschneider NH, Krause F, Dencher NA and Vonck J (2006) Architecture of active mammalian respiratory chain supercomplexes. *Journal of Biological Chemistry* 281(22): 15370–15375.

- Schägger H (2001) Respiratory chain supercomplexes. *IUBMB Life* 52(3–5): 119–128.
- Schägger H, De Coo R, Bauer MF, Hofmann S, Godino C and Brandt U (2004) Significance of respirasomes for the assembly/stability of human respiratory chain complex I. *Journal of Biological Chemistry* 279(35): 36349–36353.
- Schägger H and Pfeiffer K (2000) Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *The EMBO journal* 19(8): 1777–1783.
- Scherr M, Battmer K, Blömer U, Ganser A and Grez M (2001) Quantitative Determination of Lentiviral Vector Particle Numbers by Real-Time PCR. *Short Technical Reports* 31: 520–516.
- Schieber M and Chandel NS (2014) ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress Michael. *Curr. Biol.* 24(10): 1–25.
- Schlame M and Ren M (2009) The role of cardiolipin in the structural organization of mitochondrial membranes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. Elsevier B.V. 1788(10): 2080–2083.
- Schneider H, Lemasters JJ and Hackenbrock CR (1982) Lateral Diffusion of Ubiquinone During Electron-Transfer in Phospholipid-Enriched and Ubiquinone-Enriched Mitochondrial-Membranes. *Journal of Biological Chemistry* 257(18): 789–793.
- Scialo F, Sriram A, Fernandez-Ayala D, Gubina N, Löhmus M, Nelson G, Logan A, Cooper HM, Navas P, Enríquez JA, Murphy MP and Sanz A (2016) Mitochondrial ROS Produced via Reverse Electron Transport Extend Animal Lifespan. *Cell Metabolism* 23(4): 725–734.
- Scorrano L, Ashiya M, Buttle K, Weiler S, Oakes SA, Mannella CA and Korsmeyer SJ (2002) A Distinct Pathway Remodels Mitochondrial Cristae and Mobilizes Cytochrome c during Apoptosis. *Developmental Cell* 2: 55–67.
- Seelert H, Dani DN, Dante S, Hauß T, Krause F, Schäfer E, Frenzel M, Poetsch A, Rexroth S, Schwaßmann HJ, Suhai T, Vonck J and Dencher NA (2009) From protons to OXPHOS supercomplexes and Alzheimer's disease: Structure-dynamics-function relationships of energy-transducing membranes. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. Elsevier B.V. 1787(6): 657–671.
- Sessa WC and Fo U (2012) Nitric oxide synthases : regulation and function. 829–837.
- Sheftel AD, Stehling O, Pierik AJ, Netz DJA, Kerscher S, Elsasser H-P, Wittig I, Balk J, Brandt U and Lill R (2009) Human Ind1, an Iron-Sulfur Cluster Assembly Factor for Respiratory Complex I. *Molecular and Cellular Biology* 29(22): 6059–6073.
- Slater EC (2003) Keilin, cytochrome, and the respiratory chain. *Journal of Biological Chemistry* 278(19): 16455–16461.

- Smirnova E, Griparic L, Shurland D-L and van der Bliek AM (2001) Dynamin-related Protein Drp1 Is Required for Mitochondrial Division in Mammalian Cells. *Molecular Biology of the Cell* 12(8): 2245–2256.
- Sousa JS, Mills DJ, Vonck J and Kühlbrandt W (2016) Functional asymmetry and electron flow in the bovine respirasome. *eLife* 5: 1–17.
- Speijer D (2016) Being right on Q: shaping eukaryotic evolution. *Biochemical Journal* 473(22): 4103–4127. Available at: <http://biochemj.org/cgi/doi/10.1042/BCJ20160647>.
- Stickens D, Brown D and Evans GA (2000) EXT Genes Are Differentially Expressed in Bone and Cartilage During Mouse Embryogenesis. 218: 452–464.
- Stoner CD (1984) Steady-state kinetics of the overall oxidative phosphorylation reaction in heart mitochondria. Determination of the coupling relationships between the respiratory reactions and miscellaneous observations concerning rate-limiting steps. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 16(2): 115–41.
- Strogolova V, Furness A, Robb-McGrath M, Garlich J and Stuart RA (2012) Rcf1 and Rcf2, members of the hypoxia-induced gene 1 protein family, are critical components of the mitochondrial cytochrome bc1-cytochrome c oxidase supercomplex. *Molecular and cellular biology* 32(8): 1363–1373.
- Stuehr DJ, Fasehun OA, Kwon NS, Gross SS, Gonzalez JA, Levi R and F NC (1991) Inhibition of macrophage and endothelial cell nitric oxide synthase by diphenyleneiodonium and its analogs. *The FASEB Journal* 5(1): 98–103.
- Suthammarak W, Morgan PG and Sedensky MM (2010) Mutations in mitochondrial complex III uniquely affect complex I in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Biological Chemistry* 285(52): 40724–40731.
- Suthammarak W, Yang YY, Morgan PG and Sedensky MM (2009) Complex I function is defective in complex IV-deficient *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Biological Chemistry* 284(10): 6425–6435.
- Suzuki T, Hashimoto T, Yabu Y, Kido Y, Sakamoto K, Nihei C, Hato M, Suzuki S, Amano Y, Nagai K, Hosokawa T, Minagawa N, Ohta N and Kita K (2004) Direct evidence for cyanide-insensitive quinol oxidase (alternative oxidase) in apicomplexan parasite *Cryptosporidium parvum*: phylogenetic and therapeutic implications. *Biochemical and biophysical research communications* 313: 1044–1052.
- Szibor M, Dhandapani PK, Dufour E, Holmstro KM, Salwig I, Wittig I, Heidler J, Gizatullina Z, Gainutdinov T, Mouse G, Consortium C, Fuchs H, Gailus-durner V, Hrabe M, Nandania J, Velagapudi V, Wietelmann A, Rustin P and Gellerich FN (2017) Broad AOX expression in a genetically tractable mouse model does not disturb normal physiology. 163–171.
- Szklarczyk R and Huynen MA (2010) Mosaic origin of the mitochondrial proteome. *Proteomics* 10(22): 4012–4024.

Szklarczyk R, Wanschers BFJ, Nabuurs SB, Nouws J, Nijtmans LG and Huynen MA (2011) NDUFB7 and NDUFA8 are located at the intermembrane surface of complex I. *FEBS Letters* 585(5): 737–743.

Taylor ER, Hurrell F, Shannon RJ, Lin TK, Hirst J and Murphy MP (2003) Reversible glutathionylation of complex I increases mitochondrial superoxide formation. *Journal of Biological Chemistry* 278(22): 19603–19610.

Tiwari SK, Rohilla A, Rohilla S and Kushnoor A (2012) Reactive oxygen species: a comprehensive review. *International Journal of Current Pharmaceutical Research* 4(3): 19–23.

Treberg JR, Quinlan CL and Brand MD (2011) Evidence for Two Sites of Superoxide Production by Mitochondrial NADH-Ubiquinone Oxidoreductase (Complex I) *. *FEBS Letters* 286(31): 27103–27110.

Trouillard M, Meunier B and Rappaport F (2011) Questioning the functional relevance of mitochondrial supercomplexes by time-resolved analysis of the respiratory chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(45): E1027–34.

Turrens J, Alexandre A and Lehninger A. (1985) Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *FEBS Letters* 237: 408–414.

Twig G, Elorza A, Molina AJA, Mohamed H, Wikstrom JD, Walzer G, Stiles L, Haigh SE, Katz S, Las G, Alroy J, Wu M, Py BF, Yuan J, Deeney JT, Corkey BE and Shirihai OS (2008) Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *The EMBO Journal* 27(2): 433–446.

Ugalde C, Janssen RJRJ, van den Heuvel LP, Smeitink JAM and Nijtmans LGJ (2004) Differences in assembly or stability of complex I and other mitochondrial OXPHOS complexes in inherited complex I deficiency. *Human Molecular Genetics* 13(6): 659–667.

Vempati UD, Diaz F, Barrientos A, Narisawa S, Mian AM, Millán JL, Boise LH and Moraes CT (2007) Role of cytochrome C in apoptosis: increased sensitivity to tumor necrosis factor alpha is associated with respiratory defects but not with lack of cytochrome C release. *Molecular and cellular biology* 27(5): 1771–1783.

Vempati UD, Han X and Moraes CT (2009) Lack of cytochrome c in mouse fibroblasts disrupts assembly/stability of respiratory complexes I and IV. *Journal of Biological Chemistry* 284(7): 4383–4391.

Vukotic M, Oeljeklaus S, Wiese S, Vugt FN, Meisinger C, Meyer HE, Ziesenis A, Katschinski DM, Jans DC, Jakobs S, Warscheid B, Rehling P and Deckers M (2012) Rcf1 mediates cytochrome oxidase assembly and respirasome formation, revealing heterogeneity of the enzyme complex. *Cell Metabolism* 15(3): 336–347.

- Wallace DC, Fan W and Procaccio V (2010) Mitochondrial Energetics and Therapeutics. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 5(1): 297–348.
- Wenz T, Hielscher R, Hellwig P, Schagger H, Richers S and Hunte C (2009) Role of phospholipids in respiratory cytochrome bc₁ complex catalysis and supercomplex formation. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. 1787(6): 609–616. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.02.012>.
- Wessels HJCT, Vogel RO, Heuvel L Van Den, Smeitink JA, Rodenburg RJ, Nijtmans LG and Farhoud MH (2009) LC-MS / MS as an alternative for SDS-PAGE in blue native analysis of protein complexes. *Proteomics* 9: 4221–4228.
- Wise CA, Clines GA, Massa H, Trask BJ and Lovett M (1997) Identification and localization of the gene for EXTL, a third member of the multiple exostoses gene family. *Genome Res* 7(1): 10–16.
- Wise C, Clines G, Massa H, Trask BJ and Lovett M (1997) Identification and localization of the gene for EXTL, a third member of the multiple exostoses gene family. *Genome Research* 7(1): 10–16.
- Wittig I, Braun H-P and Schagger H (2006) Blue native PAGE. *Nature protocols* 1(1): 418–428.
- Wittig I, Carrozzo R, Santorelli FM and Schagger H (2006) Supercomplexes and subcomplexes of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1757(9–10): 1066–1072.
- Wittig I and Schagger H (2009) Supramolecular organization of ATP synthase and respiratory chain in mitochondrial membranes. *Biochimica et biophysica acta*. Elsevier B.V. 1787(6): 672–80.
- Wu M, Gu J, Guo R, Huang Y and Yang M (2016) Structure of Mammalian Respiratory Supercomplex I₁III₂IV₁. *Cell*. 167(6): 1598–1609.e10.
- Zak BM, Crawford BE and Esko JD (2002) Hereditary multiple exostoses and heparan sulfate polymerization. *Biochimica et biophysica acta* 1573(3): 346–55.
- Zhang K, Wang G, Zhang X, Hüttemann PP, Qiu Y, Liu J, Mitchell A, Lee I, Zhang C, Lee J, Pecina P, Wu G, Yang Z, Hüttemann M and Grossman LI (2016) COX7AR is a Stress-inducible Mitochondrial COX Subunit that Promotes Breast Cancer Malignancy. *Scientific Reports* 6(July): 31742.
- Zhang M, Mileykovskaya E and Dowhan W (2005) Cardiolipin is essential for organization of complexes III and IV into a supercomplex in intact yeast mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* 280(33): 29403–29408.
- Zheng W, Thorne N and Mckew JC (2016) The regulatory Roles of O-GlcNAcylation in mitochondrial Homeostasis and metabolic Syndrome. *Free Radical Biology and Medicine* 50(10): 1080–1088.

Zhu J, Vinothkumar KR and Hirst J (2016) Architecture of mammalian respiratory complex I. *Nature*. Nature Publishing Group 536: 354–58.

Zickermann V, Wirth C, Nasiri H, Siegmund K, Schwalbe H, Hunte C and Brandt U (2015) Mechanistic insight from the crystal structure of mitochondrial complex I. *Science* 347(6217): 44–49.

Publicaciones

Parte de los resultados de esta tesis doctoral se encuentran ilustrados en la siguiente publicación, la cual se encuentra adjunta en las siguientes páginas:

(1) **Guarás A**, Perales-Clemente E, Calvo E, Acín-Pérez R, Loureiro-López M, Pujol C, Martínez-Carrascoso I, Núñez E, García-Marqués F, Rodríguez-Hernández MA, Cortés A, Díaz F, Pérez-Martos A, Moraes C, Fernández-Silva P, Trifunovic A, Navas P, Vázquez J, Enríquez JA. The CoQH₂/CoQ ratio serves as a sensor of respiratory chain efficiency. **Cell reports**, 15- 1,197-209. 2016.

Durante la realización de esta tesis se ha colaborado además en otras publicaciones:

(2) **Guarás A**, Enríquez JA. Building a Beautiful Beast: Mammalian Respiratory Complex I. **Cell Metabolism**. 25-1, 4-5. 2017. (Preview)

(3) Cogliati S, Calvo E, Loureiro M, **Guarás A**, Nieto-Arellano R, García-Poyatos C, Ezkurdia I, Mercader N, Vázquez J, Enríquez JA. Mechanism of super-assembly of respiratory complexes III and IV. 539-7630, 579-582. **Nature**. 2016.

(4) Denuc A, Núñez E, Calvo E, Loureiro M, Miro-Casas E, **Guarás A**, Vázquez J, García-Dorado D. New protein-protein interactions of mitochondrial connexin 43 in mouse heart. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**. 29-5,794-803. 2016.

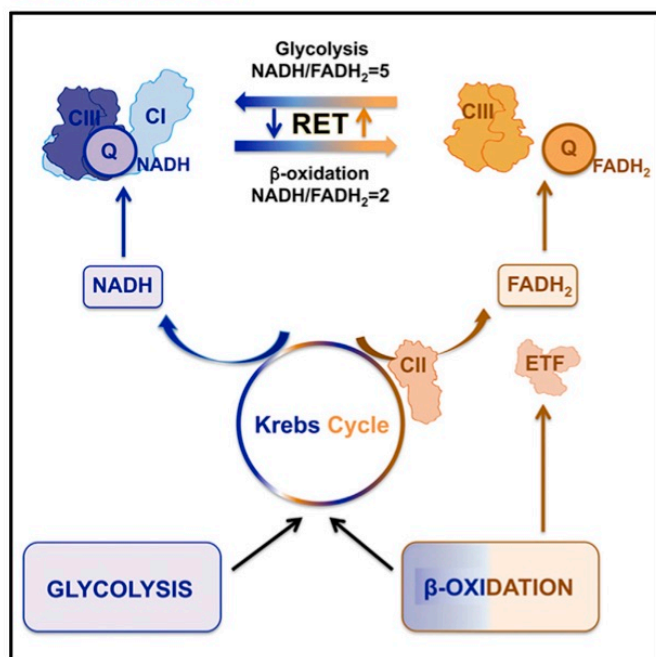
(5) Jourdain AA, Koppen M, Rodley CD, Maundrell K, Gueguen N, Reynier P, **Guarás A**, Enríquez JA, Anderson P, Simarro M, Martinou JC. A mitochondria-specific isoform of FASTK is present in mitochondrial RNA granules and regulates gene expression and function. **Cell reports**. 10, 1110-1121. 2015.

(6) García-Corzo L, Luna-Sánchez M, Doerrier C, García JA, **Guarás A**, Acín-Pérez R, Bullejos-Peregrín J, López A, Escames G, Enríquez JA, Acuña-Castroviejo D, López LC. Dysfunctional Coq9 protein causes predominant encephalomyopathy associated with CoQ deficiency. 22-6, 1233-1248. **Human Molecular Genetics**. 2012.

Cell Reports

The CoQH₂/CoQ Ratio Serves as a Sensor of Respiratory Chain Efficiency

Graphical Abstract



Authors

Adela Guarás, Ester Perales-Clemente, Enrique Calvo, ..., Plácido Navas, Jesús Vazquez, Jose A. Enriquez

Correspondence

jaenriquez@cnic.es

In Brief

Guarás et al. show how the mitochondrial electron transport chain (mtETC) is optimized to better oxidize different nutrients or fuels using the reducing status of ubiquinone as a metabolic sensor and ROS generated by complex I by reverse electron transport as an executor.

Highlights

- High CoQH₂/CoQ ratio induces reverse electron transport under physiological conditions
- RET-generated ROS induces partial complex I degradation
- Increase in the CIII fraction detached of CI optimizes mETC to consume fatty acids
- The CoQH₂/CoQ ratio serves as a sensor of respiratory chain efficiency



Guarás et al., 2016, Cell Reports 15, 197–209
April 5, 2016 ©2016 The Authors
<http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2016.03.009>

CellPress

The CoQH2/CoQ Ratio Serves as a Sensor of Respiratory Chain Efficiency

Adela Guarás,¹ Ester Perales-Clemente,¹ Enrique Calvo,² Rebeca Acín-Pérez,¹ Marta Loureiro-Lopez,² Claire Pujol,^{3,4} Isabel Martínez-Carrascoso,¹ Estefanía Nuñez,² Fernando García-Marqués,² María Angeles Rodríguez-Hernández,^{5,6} Ana Cortés,^{5,6} Francisca Díaz,⁷ Acisclo Pérez-Martos,⁹ Carlos T. Moraes,^{7,8} Patricio Fernández-Silva,⁹ Aleksandra Trifunovic,^{3,4} Plácido Navas,^{5,6} Jesús Vazquez,² and Jose A. Enríquez^{1,9,*}

¹Departamento de Desarrollo y Reparación Cardiovascular

²Laboratorio de Proteómica Cardiovascular

Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III, Madrid 28029, Spain

³Cologne Excellence Cluster on Cellular Stress Responses in Aging-Associated Diseases (CECAD)

⁴Institute for Mitochondrial Diseases and Aging, Medical Faculty

University of Cologne, 50931 Cologne, Germany

⁵Centro Andaluz de Biología del Desarrollo, Universidad Pablo de Olavide-CSIC, Sevilla 41013, Spain

⁶Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras, ISCIII, Sevilla 41013, Spain

⁷Department of Neurology, Miller School of Medicine, University of Miami, Miami, FL 33136, USA

⁸Department of Cell Biology and Anatomy, Miller School of Medicine, University of Miami, Miami, FL 33136, USA

⁹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza, Zaragoza 50009, Spain

*Correspondence: jaenriquez@cnic.es

<http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2016.03.009>

SUMMARY

Electrons feed into the mitochondrial electron transport chain (mETC) from NAD- or FAD-dependent enzymes. A shift from glucose to fatty acids increases electron flux through FAD, which can saturate the oxidation capacity of the dedicated coenzyme Q (CoQ) pool and result in the generation of reactive oxygen species. To prevent this, the mETC superstructure can be reconfigured through the degradation of respiratory complex I, liberating associated complex III to increase electron flux via FAD at the expense of NAD. Here, we demonstrate that this adaptation is driven by the ratio of reduced to oxidized CoQ. Saturation of CoQ oxidation capacity induces reverse electron transport from reduced CoQ to complex I, and the resulting local generation of superoxide oxidizes specific complex I proteins, triggering their degradation and the disintegration of the complex. Thus, CoQ redox status acts as a metabolic sensor that fine-tunes mETC configuration in order to match the prevailing substrate profile.

INTRODUCTION

The mitochondrial electron transport chain (mETC), composed of four multi-subunit complexes (complex I [CI]–complex IV [CIV]) and two electron carriers (coenzyme Q [CoQ, or ubiquinone] and cytochrome c [cyt c]), generates a transmembrane proton gradient that drives ATP synthesis by complex V (CV; ATP synthase). Freely moving respiratory complexes and mobile carriers co-exist in the inner mitochondrial membrane with larger structures called respiratory supercomplexes (SCs) (Acín-Pérez

et al., 2008; Enríquez, 2016). Most CI occurs in SCs with CIII, with or without CIV (CI+CIII+CIV, known as the respirasome, and CI+CIII) (Schägger and Pfeiffer, 2000). According to the Lapuente-Brun proposal (Lapuente-Brun et al., 2013), the dynamic organization into SCs creates two functional CIII populations, defined by association or non-association with CI. CI-bound CIII predominantly receives electrons from NADH (CIII_{NADH}), and non-CI-bound CIII (CIII_{FAD}) predominantly receives electrons from FAD-dependent enzymes (most commonly, CI). The mETC can fork to three forms of CIV, one interacting with CI+CIII (in the respirasome) to receive electrons from NADH (CIV_{NADH}), another interacting with non-CI-associated CIII to receive electrons from FAD (CIV_{FAD}), and a third population of free CIV able to receive electrons from CI+CIII and free CIII (CIV_{both}). CI+CIII and CIII+CIV interactions also define functional pools of CoQ and cyt c for carrying electrons from NADH or FAD electrons (Lapuente-Brun et al., 2013).

The CI-CIII interaction is preferential, and the amount of CI determines how much CIII is available to FADH₂ or NADH electrons. The proportion of electrons feeding into the mETC from NADH and FADH₂ varies with the carbon source. Oxidative metabolism of one molecule of glucose generates ten NADH and two FADH₂ electrons, a NADH:FADH₂ electron ratio of 5; but for a typical fatty acid (FA) like palmitate, this ratio falls to 2 (Speijer, 2011). Reorganization of the mETC superstructure in response to a substrate shift from glucose to FA was confirmed by comparing fed and starved mice. When electron flux from FAD overwhelms the oxidation capacity of CoQ_{FAD}, CI is degraded, releasing CIII from CI-containing complexes to receive FAD-derived electrons (Lapuente-Brun et al., 2013). Failure to adapt induces the generation of harmful reactive oxygen species (ROS) (Speijer, 2011). The molecular mechanism to match the mETC configuration to the relative availability of NADH and FADH₂ electrons is not known.

Here, by comparing cells in which CI degradation is exacerbated due to deficiency in CIII, CIV, or cyt c (Acín-Pérez et al.,



Cell Reports 15, 197–209, April 5, 2016 ©2016 The Authors 197
This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

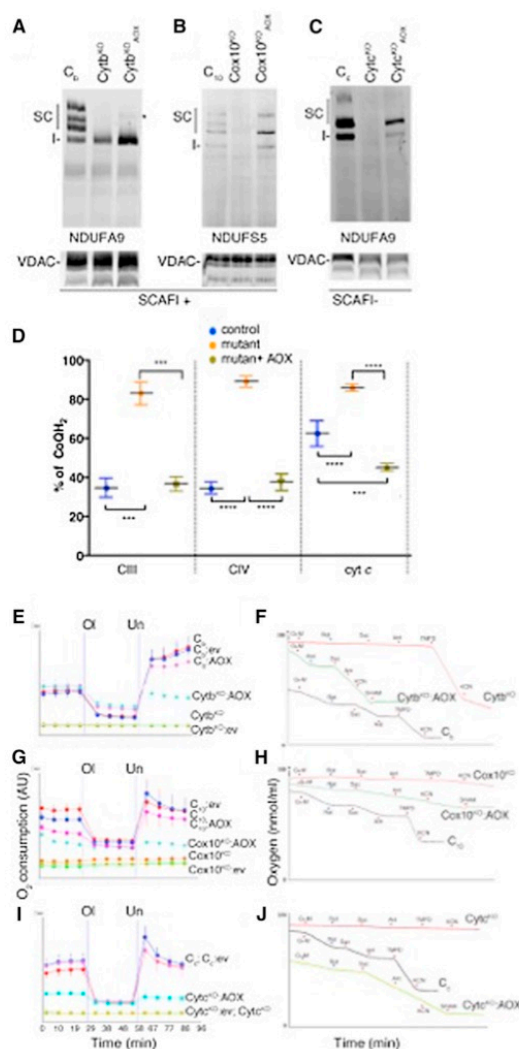


Figure 1. AOX Expression Restores Respiration in the Absence of CIII, CIV, or cyt c

(A–C) Detection of complexes and SCs in digitonin-solubilized mitochondria by western blot with the indicated antibodies against the CI component Ndufa9; VDAC (voltage-dependent anion channel protein) was used as a loading control. (A) Cb (isogenic control), *Cytb*^{KO} (lacking CIII), and *Cytb*^{KO}AOX cells. Star indicates a new, slow-migrating band containing CI but no other respiratory complex. (B) *C₁₀* (isogenic control), *Cox10*^{KO} (lacking CIV), and *Cox10*^{KO}AOX cells. (C) Cc (isogenic control), *Cytc*^{KO} (lacking cyt c), and *Cytc*^{KO}AOX cells. (D) Estimated percent CoQH₂ in mutant cells versus isogenic controls and the effect of AOX expression. Data are mean \pm SD; n = 3 to 6. Statistical differences assessed by ANOVA ($p < 0.0001$) and Tukey's multiple comparisons test. *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ by one-way ANOVA Fisher's LSD multiple comparisons test.

2004; Diaz et al., 2006; Vempati et al., 2009), we demonstrate that CI is degraded when reduced ubiquinone (or CoQH₂) accumulates in the presence of oxygen. The resulting reverse electron transport (RET) generates superoxide, which oxidizes critical CI proteins, inducing their degradation. Finally, we show in vivo that modulation of FADH₂ electron flux to CoQ acts as a metabolic sensor, allowing mitochondria to rebalance the relative proportions of respiratory complexes to accommodate variable electron flux ratios from NADH and FADH₂.

RESULTS

CI Is Degraded in the Absence of CIII, CIV, or cyt c

To investigate the mechanism controlling the degradation of mitochondrial CI, we exploited the instability of CI assembled in cultured cells lacking CIII, CIV, or cyt c (Acín-Pérez et al., 2004, 2008; Diaz et al., 2006; Vempati et al., 2009). Most CI occurs in stable association with CIII (Acín-Pérez et al., 2008; Schagger and Pfeiffer, 2000), and we proposed elsewhere that this interaction stabilizes CI (Acín-Pérez et al., 2004). The steady-state level of fully assembled complexes was assessed by blue native gel electrophoresis (BNGE) followed by western blot. As reported elsewhere, in *Cytb*^{KO} cells, which do not assemble CIII, CI is assembled but is unstable and rapidly degraded (Acín-Pérez et al., 2004) (Figure 1A). For unknown reasons, the amount of free CI remaining in the steady state in *Cytb*^{KO} cells, though below the level in isogenic control cells (Cb), has increased over the years in culture. CI becomes unstable in cells lacking *cox10* (*Cox10*^{KO}), which are unable to assemble CIV (Diaz et al., 2006) (Figure 1B) and in cells lacking cyt c (*Cytc*^{KO}), which also do not assemble CIV (Vempati et al., 2009) (Figure 1C). It should be noted that *Cytc*^{KO} cells and isogenic control cells (Cc) cannot incorporate CIV into SCs because they are derived from C57BL/6J mice, which harbor a mutation in SCAFI, the assembly factor required for CIII and CIV association (Lapiente-Brun et al., 2013).

Alternative Oxidase Stabilizes CI in the Absence of CIII, CIV, or cyt c

The primary consequence for cells of the lack of CIII, cyt c, or CIV is blockade of CoQH₂ oxidation (Figure 1D), stalling all CoQ-dependent enzymes. As a result, NADH oxidation by CI (from the matrix) and G3PDH (from the cytoplasm) is blocked, the tricarboxylic acid (TCA) cycle cannot progress from succinate to fumarate, and β -oxidation is stopped. This imbalance could trigger signaling routes to induce CI degradation. To gain knowledge about the molecular control of CI degradation, we first investigated the link between CI degradation and CoQ redox status. We inquired whether reducing CoQH₂ accumulation affected CI stability by expressing the alternative oxidase

(E–J) In (E), (G), and (I), oxygen consumption rates in the indicated cell lines are shown. Vertical lines mark the addition of oligomycin (Ol) or uncoupler (Un). In (F), (H), and (J), polarograph traces show O₂ consumption (nanomoles per milliliter) by the indicated cell lines. Arrowheads mark addition of the following agents: G+M, glutamate plus malate; Rot, rotenone; Suc, succinate; Ant, antimycin A; TMPD, N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine; KCN, potassium cyanide; SHAM, salicylhydroxamic acid. C_b, C₁₀, and C_c, isogenic control cells. ev, empty vector.

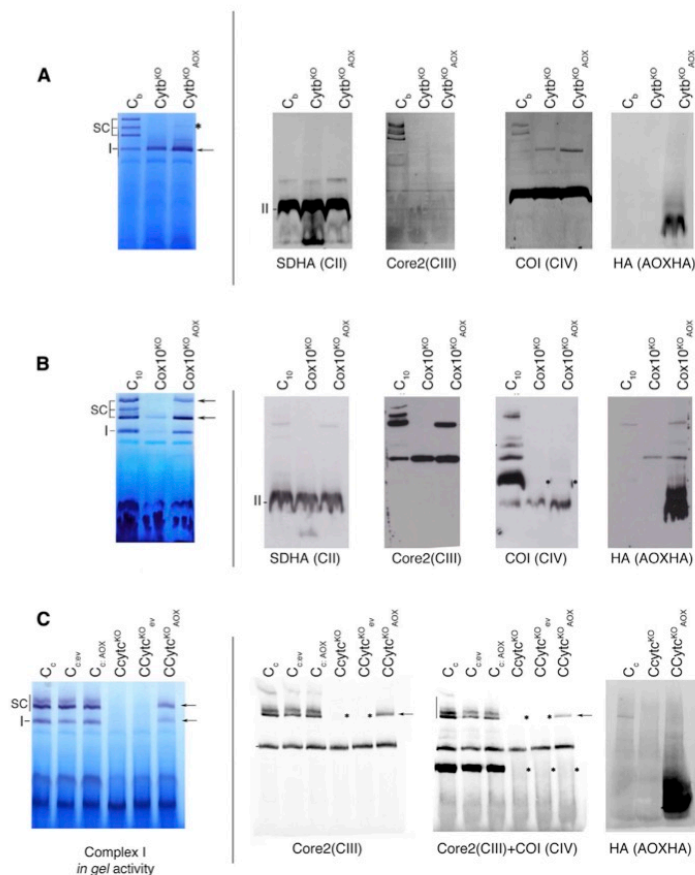


Figure 2. AOX Expression Stabilizes CI in the Absence of CIII, CIV, or cyt c

Restoration of assembled CI (arrows) was assessed by the detection of complexes and SCs in digitonin-solubilized mitochondria by in-gel CI activity assay after development of the reaction for 1 hr and by western blot with the indicated antibodies against AOX-HA and components of CII, CIII, and CIV.

(A) Cytb^{KO} and Cytb^{KO}AOX cells.

(B) Cox10^{KO} and Cox10^{KO}AOX cells.

(C) Cytc^{KO} and Cytc^{KO}AOX cells. C_b, C₁₀ and C_c, isogenic control cells. ev, empty vector.

Arrows in (A)–(C) indicate CI-containing bands, while asterisk indicates positions where the expected complexes or SCs are absent.

Restoration of CI (in SC CI+CIII) was pronounced in Cox10^{KO}AOX cells (Figures 1B and 2B), with no effect on CIV levels (Figure 2B). Similar results were observed in Cytc^{KO}AOX cells, with restoration of CI but no recovery of CIV (Figures 1C and 2C), confirming that the molecular bases for the absence of CI and CIV in Cytc^{KO} cells are different. AOX stabilizes CI without physically interacting with it (Figures 2 and S1).

To further analyze CI stabilization by AOX, we selectively labeled mtDNA-encoded oxidative phosphorylation (OXPHOS) subunits by a 2-hr pulse with [³⁵S] Met-Cys and tracked incorporation of labeled proteins into fully assembled complexes over a 12-hr chase period. 1D BNGE analysis of labeled digitonin-solubilized mitochondria revealed the typical band pattern corresponding to isolated CI and SCs in control cells (Figure S2). Mutant cells contained all respiratory complexes except CIII (in Cytb^{KO} and Cytb^{KO}AOX cells) and CIV (in Cox10^{KO}, Cox10^{KO}AOX, Cytc^{KO}, and Cytc^{KO}AOX cells) (Figure S2). The specific labeling of mtDNA-encoded subunits was resolved by 2D BN-SDS-PAGE. Cytb^{KO}, Cox10^{KO}, and Cytc^{KO} cells are able to assemble CI, but the instability of CI in these cells is revealed by the presence of labeled assembly intermediates or degradation products (Figure S2). Expression of AOX prevented accumulation of these abnormal assemblies, stabilizing CI either as a free complex or in SC CI+CIII in cell lines in which CIII is assembled (Figure S2).

Rotenone Stabilizes CI in the Presence of High CoQH₂

Restoring electron flux would normalize the NAD⁺/NADH ratio, TCA cycle function, and CoQ redox status. To determine whether destabilization of CI requires interaction with CoQ in conditions where metabolic fluxes are not restored, we blocked this interaction by adding rotenone, which competes with ubiquinone for binding to CI (Murphy, 2009). Rotenone

(AOX) from *Emmericella nidulans* (Perales-Clemente et al., 2008). The expression of AOX restored a normal COQH₂:COQ ratio (Figure 1D) and respiration (Figures 1E, 1G, and 1I) without inducing major changes in the overall CoQ content (Table S1), consistent with its ability to restore respiration in cells lacking mtDNA (Perales-Clemente et al., 2008). Interestingly, AOX expression recovered not only succinate (CII)-driven respiration but also rotenone-sensitive glutamate/malate (CI)-driven respiration (Figures 1F, 1H, and 1J), indicating recovery of CI function. Consistent with the activity data, analysis of the assembly status of respiratory complexes by BNGE detected increased amounts of assembled CI in Cytb^{KO}AOX cells (Figure 1A). No CIII-containing bands were observed in Cytb^{KO} or Cytb^{KO}AOX cells (Figure 2A), even after overexposure of blots, and the absence of CIII prevented formation of SCs (Figures 1A and 2A). AOX expression promoted the formation of a new band, containing CI without CIII₂ or CIV, which was not investigated further (Figures 1A and 2A). Immunodetection of CII and CIV showed no variation in these assembled complexes (Figure 2A).

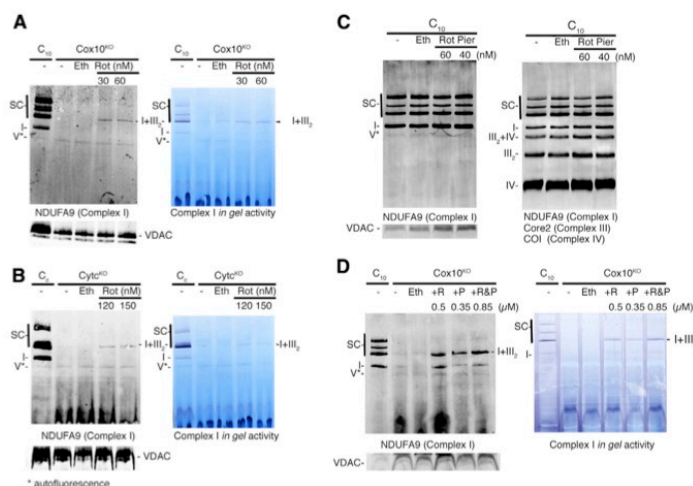


Figure 3. Rotenone Stabilizes CI in the Absence of CIV and *cyt c*

(A–D) Cells deficient for CIV (*Cox10^{KO}* in A and D), *cyt c* (*Cyt c^{KO}* in B), or an isogenic control for *Cox10^{KO}* (*C₁₀* in C) were treated for 48 hr at 21% O_2 with the indicated concentration of rotenone (Rot), piericidin A (Pier), or vehicle (ethanol; Eth). (A–D, left panels) Western blot after BNGE for CI (anti-NDUF9) in digitonin-solubilized mitochondrial proteins; VDAC was detected as loading control. (A, B, and D, right panels) In-gel CI activity assay in BN gels incubated with NADH and nitro-blue tetrazolium. (C, right) Parallel Western blot after BNGE with the indicated antibodies.

concentrations $>0.25 \mu$ M have mETC-unrelated toxic effects (Hofhaus and Attardi, 1995). To avoid confounding effects, we initially investigated the impact of low-nanomolar rotenone concentrations. At these concentrations, rotenone modestly stabilized CI in *CIV^{KO}* cells (*Cox10^{KO}* and *Cyt c^{KO}*) (Figures 3A and 3B) without influencing wild-type cells (Figure 3C). When rotenone concentration was increased to 500 nM, or when we used piericidin A, another antibiotic that competes with CoQ for interaction with CI, we found a stronger effect, confirming that blockade of CoQ–CI interaction without restoring electron flux stabilizes CI (Figure 3D).

Overexpression of SOD2 and Lowering of Oxygen Concentration Stabilizes CI

The CI-stabilizing effect of rotenone highlights the importance of the CoQ–CI interaction in CI degradation. When CoQ is reduced (high $CoQH_2$) because electrons cannot flow forward through CIII and CIV, they instead flow back to CI, a process known as RET. This backward flux can be induced by succinate, α -glycerophosphate, or β -oxidation and is critical in post-ischemia injury (Chouchani et al., 2014). When RET is induced, CI produces elevated amounts of superoxide (ROS), and this can be prevented by rotenone (Murphy, 2009). Overexpression of SOD2 in *Cox10^{KO}* cells stabilized CI only weakly (Figures 4A and 4B), perhaps reflecting the inability of SOD2 to access and eliminate ROS generated in CI before they cause the oxidative damage that leads to degradation (Murphy, 2009).

As an alternative ROS-reducing strategy, we examined the effect of long-term cell culture at low oxygen concentration on the stability of CI in the mutants. Whereas acute hypoxia (minutes) induces mitochondrial ROS production, long-term hypoxia prevents ROS production (Hernansanz-Agustín et al., 2014). Culture at 1% O_2 for 48 hr stabilized CI in *Cox10^{KO}* cells (Figure 4C). To confirm the influence of oxygen concentration, we exposed *Cox10^{KO}* cells grown at 1% O_2 for 48 hr to different periods of re-

oxygenation at 21% O_2 (1, 4, and 7 hr). Upon reoxygenation, hypoxia-stabilized CI became unstable again (Figure 4D). Reoxygenation-induced CI degradation was prevented by rotenone (Figure 4E), and rotenone alone stabilized CI as efficiently as hypoxia in a time-dependent manner (Figure 4E).

Culturing *Cyt c^{KO}* cells in 1% O_2 induced a weaker, but still significant, CI stabilization (Figure 4F); in contrast, CIV was not restored. The third mutant, *Cyt b^{KO}*, also clearly increased the steady-state level of CI upon 3-day culture at 1% O_2 (Figure 4G). In wild-type cells (*Cb*), 1% O_2 slightly but conspicuously affected the distribution of CI in SCs, with reductions in the levels of free CI and the respirasome (CI+CIII+CIV) (Figure 4G).

The observed effect was not mediated by decreased $CoQH_2$ accumulation (Figure S3A). Hypoxia also promotes a general transcriptional response by stabilizing hypoxia-induced transcription factors (Koh and Powis, 2012). To determine whether the HIF1 α -dependent transcriptional program influences hypoxia-induced CI stabilization and reoxygenation-induced degradation, we stabilized HIF1 α in normoxia by treating *CIV^{KO}* cells with dimethylxallyl glycine (DMOG), an inhibitor of PHF and FIH-1 that upregulates HIF-1 α . After 72-hr exposure to DMOG or hypoxia, the HIF1 α -dependent transcription program was robustly activated in control and *Cox10^{KO}* cells, as indicated by increased mRNA expression of the HIF1 α targets Pdk1 and Phd3 (Figure S3B). However, activation of the HIF1 α program by DMOG in normoxia did not stabilize CI (Figure S3C).

Oxidation of CI Proteins Precedes CI Degradation

In contrast with assembled CI, total CI proteins (assembled or not) stabilized by hypoxia increased initially upon reoxygenation and then decreased over 12 hr to the levels seen in hypoxia (Figure S4A). To define the time-course behavior of individual CI proteins, we conducted a quantitative proteomics analysis by ^{18}O stable isotope labeling and mass spectrometry. Hierarchical clustering analysis of protein amounts, validated by western blot determinations, revealed distinct stability behaviors that cluster the proteins into at least four groups (Figures 5A and 5B). The least stable group contains subunits of the dehydrogenase and hydrogenase modules NDUFV1, NDUFV2, NDUFV3, and NDUFV4 and others in the peripheral arm of CI (Figure 5A).

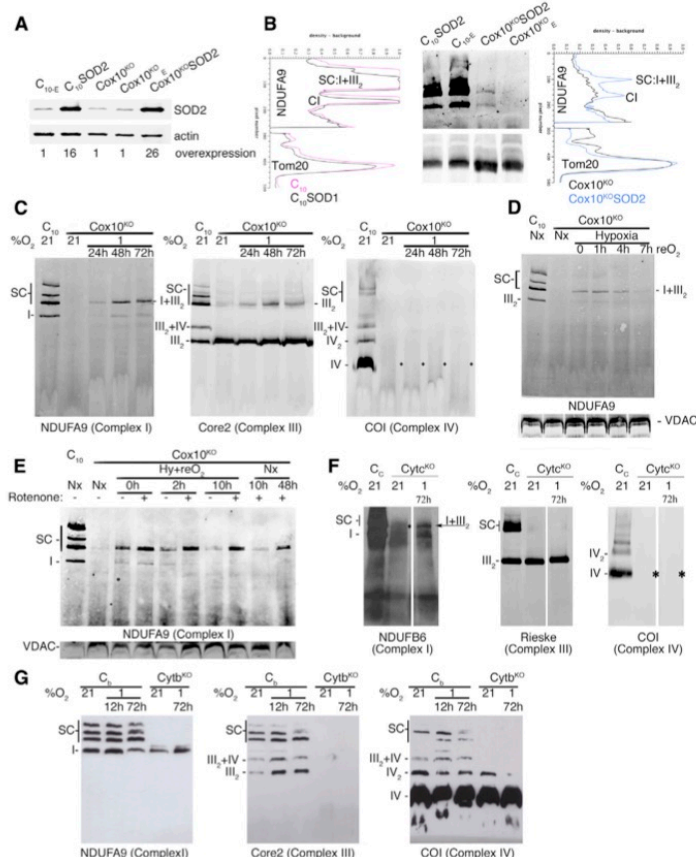


Figure 4. ROS Generation Blockade Stabilizes CI

(A) Western blot after SDS-PAGE showing mitochondrial overexpression of SOD2 in C_{10} or $Cox10^{KO}$ cells. E subindex, empty vector.

(B) Center: western blot after BNGE for CI (anti-NDUFA9) or Tom20 (loading control) in digitonin-solubilized mitochondrial proteins from C_{10} or $Cox10^{KO}$ cells overexpressing SOD2. Left: densitometry traces of lines 1 and 2 of the gel. Right: densitometry traces of lines 3 and 4 of the gel.

(C) BNGE and western blot of digitonin-solubilized mitochondrial proteins isolated from wild-type cells (C_{10}) or cells lacking CIV ($Cox10^{KO}$) cultured at 21% O_2 or 1% O_2 for the indicated times. Blots were probed with the antibodies indicated below the blots to detect CI (left), CIII (center), or CIV (right).

(D and E) BNGE of digitonin-solubilized mitochondrial proteins from control cells (C_{10}) or cells lacking CIV ($Cox10^{KO}$) cultured for 72 hr (D) or 48 hr (E) at 1% O_2 to stabilize CI and then transferred to 21% O_2 to track the fate of CI over the indicated periods in the absence or presence of rotenone. (E) Lines 9 and 10, time course of rotenone-induced CI stabilization in normoxia (Nx).

(F) Analysis as in (C) of mitochondrial proteins isolated from control cells (Cc) or cells lacking cyt c (Cyt^{KO}) cultured at 21% or 1% O_2 .

(G) Analysis as in (C) of mitochondrial proteins isolated from control cells (Cc) or cells lacking CIII (cytochrome b deficient; $Cytb^{KO}$) cultured at 21% or 1% O_2 .

CIII₂, CIII dimer; I+III₂, SC containing CI and CIII; III₂+IV, SC containing CIII and CIV. Asterisks in (C and F) highlight CIV depletion.

A second cluster follows a slightly delayed degradation pattern and includes NDUFS1 and NDUFS7 from the hydrogenase module, as well as the accessory peripheral arm subunits NDUFA2 and NDUFA12 (Figures 5A and 5B). Clusters 3 and 4 contain stable proteins (among them, NDUFA9) that are subunits of the CI membrane arm (Figures 5A and 5B). Notably, protein components of the other OXPHOS complexes did not show a pattern of changes consistent with their degradation (Figure S4B). These observations suggest that reoxygenation produces protein degradation locally within CI, particularly in the dehydrogenase and hydrogenase modules. In fact, the more stable proteins (cluster 4), such as NDUFA9, can be detected in subcomplexes in cells lacking CIV (Figure 5C).

To determine the relationship between protein degradation and oxidative damage, we performed a high-throughput, data-independent, quantitative redox proteomics analysis with GELSILOX (Martínez-Acedo et al., 2012) of mitochondrial proteins of $Cox10^{KO}$ cells grown under hypoxia to stabilize CI and after different periods of reoxygenation. The screen detected

oxidized state in mitochondrial proteins was quite low, at around 16%. This quickly increased when the cultures were moved to 21% O_2 , peaking after 4 hr at 22%, and dropping again with prolonged normoxia (Figure S4C). This effect was particularly pronounced for the protein components of CI, whose proportion of oxidized cysteines increased from 32% at 1% O_2 to 50% after 4 hr at 21% O_2 (Figure S4C). In contrast, CII did not show such a pronounced increase, following instead the overall pattern of total mitochondrial cysteines (Figure S4C). Interestingly, a peak in oxidized cysteines at 4-hr reoxygenation was also observed for components of CIII (Figure S4C), the complex that partially superassembles with CI, despite the absence of signs of degradation of CIII subunits (Figure S4B).

Cysteines monitored in NDUFS5, NDUFA8, and NDUFB7, which face the mitochondrial intermembrane space, were only detected in the oxidized form (Figure 5D), consistent with their likely participation in stable intramolecular disulfide bonds (Szklarczyk et al., 2011). NDUFV1 and NDUFS1 are subunits of the NADH dehydrogenase module, and NDUFS2 is a subunit

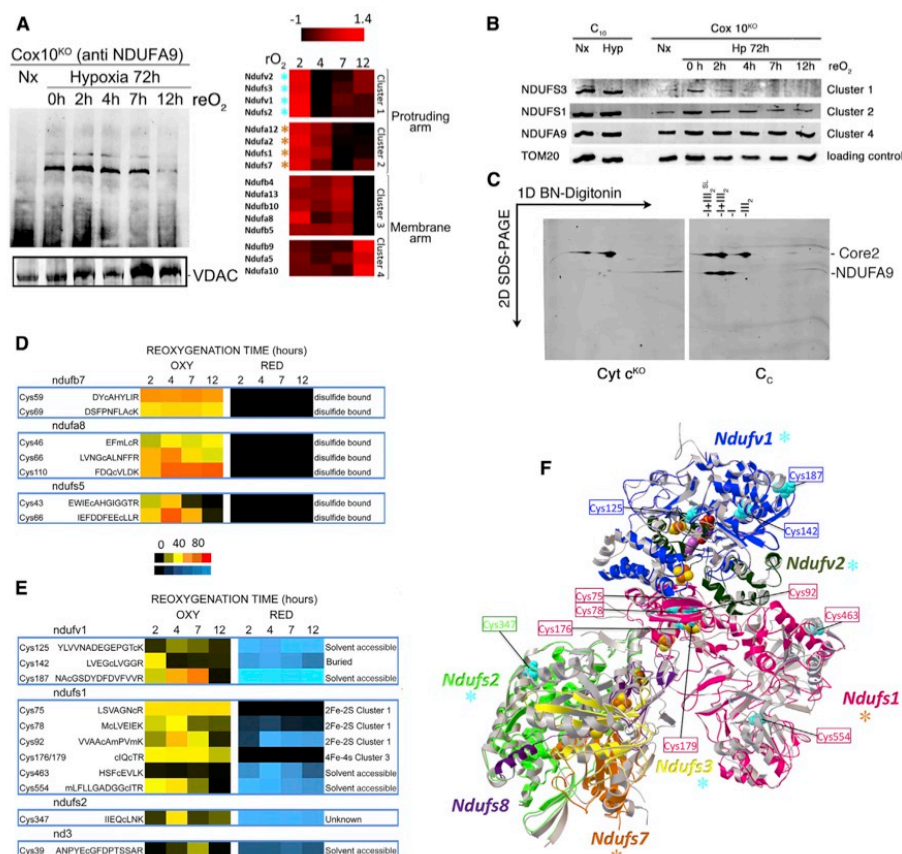


Figure 5. Mass Spectrometry Analysis of Oxidative Alterations in CI Proteins from CIV-Deficient Cells

(A) Left: immunodetection of CI (anti-NDUFA9) after BNGE of digitonin-solubilized mitochondria grown in normoxia (Nx), hypoxia (Hypoxia 72 h) and after the indicated times of posthypoxia reoxygenation (reO₂). VDAC was immunodetected as a loading control on the BN gel. Right: Heatmap showing the timing of degradation of individual CI proteins after posthypoxia reoxygenation. Color intensity represents the change in protein concentration in relation to the hypoxia condition, in log₂-ratio units, determined by quantitative proteomics (¹⁸O/¹⁶O isotope labeling). Four groups of proteins, classified according to stability, were obtained by hierarchical clustering analysis (Genesis v 1.7.6, Institute of Molecular Biotechnology, Graz University of Technology). The clustering groups proteins that are in physical contact in the CI structure; the less stable proteins are those in the protruding arm of CI (clusters 1 and 2), and the more stable are those in the membrane arm (clusters 3 and 4).

(B) Western blot validation of the differential stability detected by proteomics upon hypoxia (Hx) and reoxygenation.

(C) Immunodetection of Ndufa9 after BNGE followed by second-dimension SDS-PAGE in cells lacking cyt c (Cyt c^{KO}) and isogenic controls (C_c), both grown in normoxia (Nx). Core 2 (CIII protein) and NDUFA9 (CI protein).

(D and E) Semiquantitative heatmap analysis of the relative levels of oxidized (OXY) and reduced (RED) cysteine-containing peptides from the indicated mitochondrial proteins detected by data-independent DIS-MS, as assessed by SpScore (used by SEQUEST to rank peptide candidates), according to the indicated color scales. Peptides were obtained from mitochondria of Cox10^{KO} cells grown in hypoxia (1% O₂, 72 hr) and after reoxygenation (21% O₂) for the indicated times. The proposed roles of cysteine oxidation status are indicated in (D) (peptides from CI subunits facing the intermembrane space: NDUFB7, NDUFA8, and NDUFS5) and (E) (peptides from matrix-protruding subunits: NDUFV1, NDUFS1, NDUFS2, and ND3).

(F) Localization of subunits and detected cysteine sites (cyan) in the modeled CI structure; the FMN group is shown in purple, and the Fe-S centers in yellow/red. The colored asterisks indicate stability of the proteins as shown in (A).

of the hydrogenase module (Figure 5F). All three locate at the hydrophilic protrusion of CI into the mitochondrial matrix. The detailed structure of mammalian CI is still not fully resolved

(for an updated model, see Hirst, 2013 and Vinothkumar et al., 2014), but that of *T. Thermophilus*, which contains NDUFV1, NDUFS1, and NDUFS2 orthologs (Nqo1, Nqo3, and Nqo4), has

been resolved (Baradaran et al., 2013; Efremov et al., 2010). None of the three cysteines detected in NDUFV1 are conserved in Nqo1 (Table S2), but five of the seven cysteine residues detected in NDUFV1 are conserved in Nqo3 and coordinate iron-sulfur cluster 1 (Cys⁷⁵, Cys⁷⁸, and Cys⁹²) and cluster 3 (Cys¹⁷⁶ and Cys¹⁷⁹). The only cysteine site monitored in NDUFV2 (Cys³⁴⁷) is not conserved in Nqo4. In these proteins, the profile of detected oxidized forms changed after reoxygenation, but the cysteine sites in the same or different proteins showed defined response patterns (Figure 5E). The three cysteine sites in NDUFV1 were found in both the oxidized and reduced states (see Figures S4D and S4E for a representative example), but in all cases, the oxidized form was more sensitive to reoxygenation, rising to a maximum at 2 hr for Cys¹⁴², 4 hr for Cys¹²⁵, and 7 hr for Cys¹⁸⁷, followed in all cases by rapid disappearance, suggesting that the oxidized forms are unstable upon reoxygenation (Figure 5E). Although the role of these cysteine sites is unknown, computer simulations suggest that Cys¹²⁵ and Cys¹⁸⁷ are solvent accessible, whereas the more sensitive Cys¹⁴² is buried in the protein (Figure 5F). A similar pattern was detected for a cysteine site monitored in NDUFV2, whose oxidized form reached a maximum at 4 hr post-reoxygenation and then dropped away. In NDUFV1, Cys⁷⁵, Cys¹⁷⁶, and Cys¹⁷⁹ were only found in the oxidized state, in agreement with their role in the formation of iron-sulfur clusters, where they are not expected to be directly accessible to alkylation before treatment with the reducing agent (Figure 5E). In contrast, Cys⁷⁸ and, more clearly, Cys⁹², part of iron-sulfur cluster 1, showed marked sensitivity to reoxygenation, with the reduced forms progressively replacing the oxidized forms, suggesting progressive damage to the iron-sulfur cluster. NDUFV1 residues Cys⁴⁶³ and Cys⁵⁵⁴ were mainly detected in the reduced form, consistent with their likely exposure to solvent (Figure 5F). Cys⁵⁵⁴ showed a transient increase in oxidation that peaked 4 hr after reoxygenation. Interestingly, Cys⁴⁶³ and Cys⁵⁵⁴ are reported to be sensitive to oxidation upon glutathione depletion in brain mitochondria (Danielson et al., 2011) (Table S2).

Cys³⁴⁷ in NDUFV2 and Cys³⁹ in ND3 were mainly detected in the reduced form. Interestingly, these sites also showed transient increases in oxidation at 4 and 7 hr, respectively. While the role of Cys³⁴⁷ is unknown, Cys³⁹ is implicated in the transition between the activated and deactivated forms of CI in response to myocardial ischemia/reperfusion injury (Galkin et al., 2008). In agreement with predictions by Galkin et al., we found this cysteine to be very exposed after hypoxia (Galkin et al., 2009); the peak in its oxidation at 7 hr reoxygenation may reflect the instability of CI upon recovery of the functional oxidized form, since this coincides with its preferential elimination.

Taken together, these data indicate that reoxygenation produces the transient oxidation of critical cysteine sites, among them, those located in iron-sulfur clusters in the hydrogenase and NADH dehydrogenase CI modules. The destabilization of iron-sulfur clusters and of other critical cysteine sites probably induces degradation of subunits within these modules, in turn, triggering the disassembly of CI, thus providing a potential molecular explanation that links specific cysteine oxidation to the differential stability and degradation of CI proteins during reoxygenation.

RET Regulates the Physiological CI/CII Balance

Inhibition of the activity of CIII and CIV in wild-type cells did not induce complete CI degradation, but significantly reduced the amount of CI and specifically affected its superassembly status (Figures 6A–6D). This is consistent with our earlier observation that pharmacological inhibition of CIII activity does not fully mimic the effect of physical ablation of CIII on CI stability (Acín-Pérez et al., 2004). The decrease in CI induced by pharmacological inhibition of CIII or CIV was prevented by rotenone (Figures 6C and 6D), linking the CI stabilization effect of rotenone in mutant and wild-type cells.

Next, we reproduced in cultured cells our *in vivo* observation that the mETC adapts to fuels that generate different proportions of NADH and FADH₂ by increasing or reducing the amount of CI (Lapiente-Brun et al., 2013). Wild-type cells were fed one of three carbon sources: galactose, glucose, or FAs (AlbuMAX). The switch from glucose to galactose maintains the same feed to the mETC through pyruvate and thus should not alter the NADH:FADH₂ ratio; this switch did not induce major changes in CI amount or superassembly status (Figure 6A, right panel; Figure S5A). In contrast, switching from glucose to FAs should decrease the NADH:FADH₂ ratio, and in this case, it induced a reduction of CI content, reproducing the effect of inhibiting CIII or CIV, with a more marked effect on free CI and the slow-migrating CI+CIII SC than on fast-migrating CI+CIII (Figure 6A, right panel; Figure S5A). Note that the cells used in Figure 6A were derived from C57BL/6J mice and lack SCAFI; therefore, they are unable to assemble CIV into SCs (Lapiente-Brun et al., 2013). Switching to FAs in SCAFI-positive cells triggered a similar reduction in total CI, which was more evident in slow-migrating CI+CIII and CI+CIII+CIV (Figure 6B, right panel; Figure S5B). To evaluate whether there is a correlation between substrates that yield different NADH:FADH₂ electron ratios and adjustments to the proportion of CI, we tested the consequences of feeding cells with ketone bodies instead of glucose (Figures 6E and 6F). An equimolar mix of beta-hydroxybutyrate (K-HB) and acetoacetate would theoretically yield a NADH:FADH₂ electron ratio of 3.5, well below the ratio of 5 that was obtained with glucose or galactose. In both SCAFI-positive and SCAFI-negative cells, ketone bodies induced a reduction in CI similar to that promoted by FA (Figure 6E and 6F).

As expected, inhibition of electron flux downstream of CoQ by pharmacological inhibition of CIII or CIV significantly increased CoQ reduction, and this effect was blocked by rotenone (Figure 6G). The change in carbon source that induced reduction in CI correlated with an FA-induced elevation in CoQH₂ (Figure 6G) and with elevated ROS production (Figure 6H). Moreover, FA-induced ROS elevation was prevented by rotenone, which nonetheless induced ROS in galactose-fed cells (Figure 6H). Thus, the switch from glucose to FA increases CoQH₂, promoting RET and leading to CI degradation.

To confirm a direct link between RET and CI-degradation-mediated mETC remodeling in wild-type cells, we activated CII by enhancing its phosphorylation by the H₂O₂-triggered tyrosine kinase Fgr (Acín-Pérez et al., 2014; Nath et al., 2015). This was achieved by adding xanthine and xanthine oxidase to the culture medium to generate H₂O₂, thereby enhancing delivery of FADH₂ electrons to CoQ (Acín-Pérez et al., 2014). H₂O₂ derived from

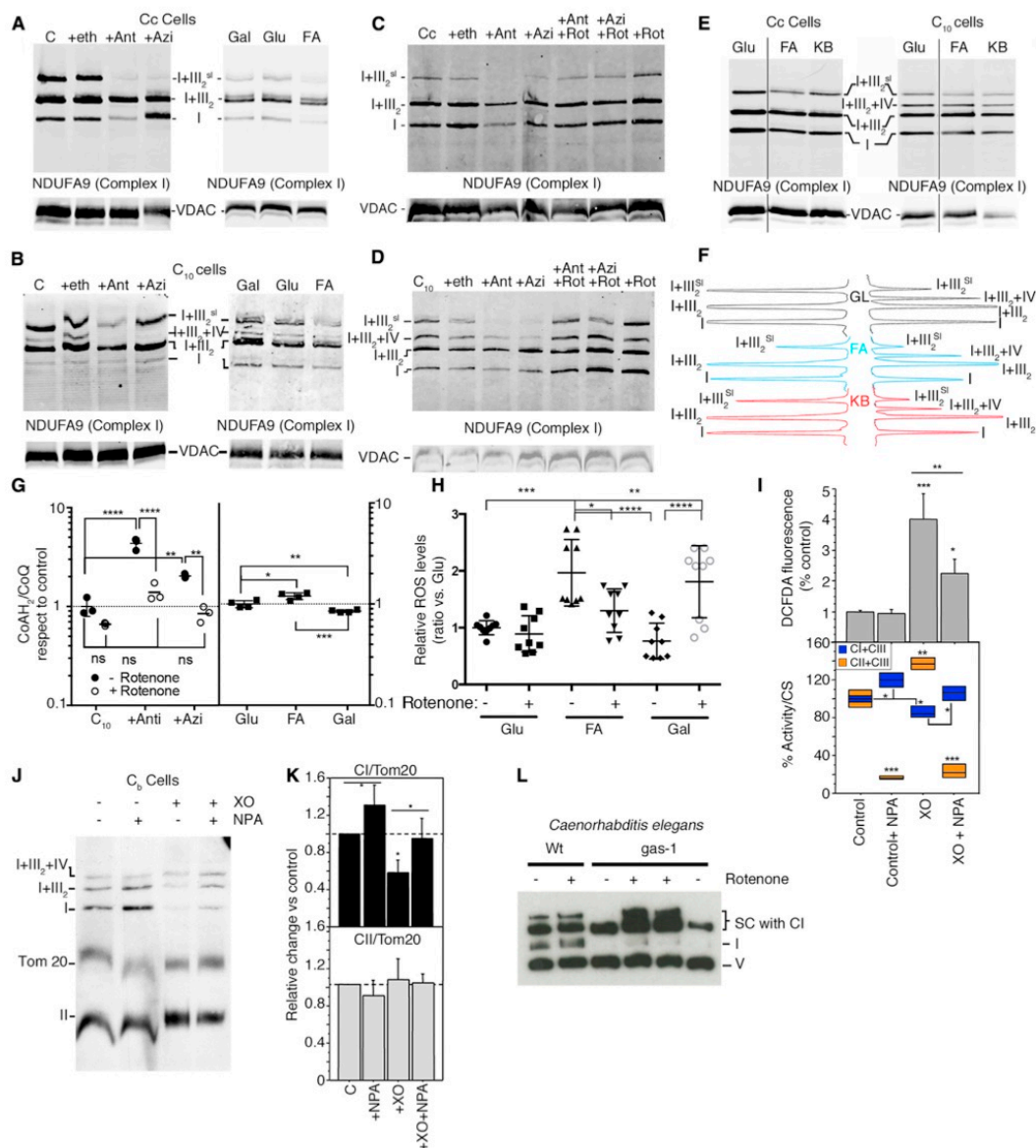


Figure 6. Activation of Electron Flux through the FAD Pathway, by FAs or Activation of CII, Downregulates CI Content

(A–D) In (A) and (B), left, and (C) and (D), control cells isogenic for the Cyt c^{KO} line (Cc) or the Cox10^{KO} line (C₁₀) reorganize CI superassembly and amount upon pharmacological inhibition (48 hr) of CIII with antimycin A (+Ant), CIV with azide (+Azi), or CI with rotenone (+Rot); eth, ethanol (vehicle). (A and B, right) CI remodeling 24 hr after changing the carbon source from glucose (Glu) to galactose (Gal) or FAs in Cc or C₁₀ cells.

(E) CI remodeling 24 hr after changing the carbon source from Glu to FA or ketone bodies (KB) in Cc or C₁₀ cells.

(F) Densitometric traces of the electrophoretic lines shown in (E).

(G) CoQH₂/CoQ fold change rate after inhibition of CIII or CIV with the indicated drug in the presence or absence of rotenone or 24 hr before fuel shift. Data are mean ± SD; n = 3–4.

(legend continued on next page)

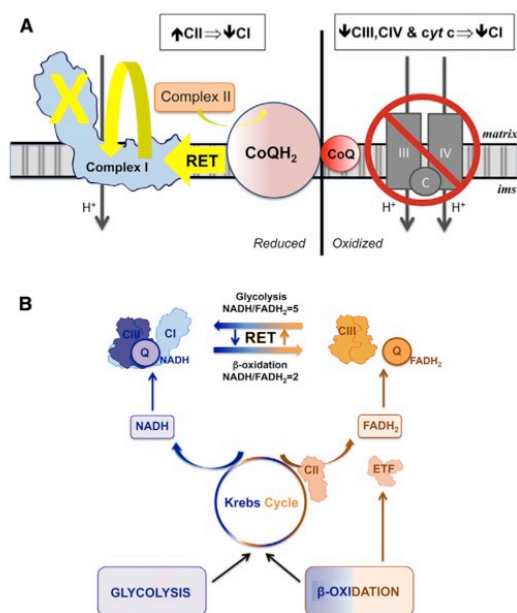


Figure 7. Proposed Physiological Role of RET

(A) Model of the relationship between RET from CoQ to CI, superoxide production at CI, and concomitant oxidative tagging of CI for degradation.

(B) Model of the physiological role of RET. Different fuel sources generate a characteristic ratio of NADH- and FADH₂-derived electrons. The mETC reconfigures to optimize oxidation capacity. When delivery of FADH₂ electrons surpasses a threshold, RET is induced and CI degraded, liberating CIII to oxidize CoQFAD, thereby reducing RET. ETF: electron transfer flavoprotein.

xanthine oxidation was readily detected (Figure 6I). Inhibition of CII with nitropropionic acid in H₂O₂-treated cells significantly reduced ROS, indicating that the addition of external H₂O₂ triggers a second wave of H₂O₂ from an internal source that requires CII activity (Figure 6I). Inhibition of CII in the absence of H₂O₂ increased CI+CIII activity and the relative amount of assembled CI, whereas activation of CII with H₂O₂ had the opposite effect (Figures 6I–6K). H₂O₂-induced CI loss was prevented by CII inhibition with nitropropionic acid and in cells lacking Fgr kinase (SF5C) or with a mutated target tyrosine in the 70Kd CII subunit

(SF5D). The FgrKO and CII-phosphorylation-deficient cells both had low CII activity that was insensitive to activation by externally derived H₂O₂ (Figures S5C and S5D). CI activity in these cells was not inhibited by xanthine and xanthine oxidase, showing that this inhibition requires CII activation (Figures S5C and S5D). These experiments establish a causal link between RET and the loss of CI in wild-type cells upon activation of delivery of FADH₂ electrons (Figure 6). To evaluate whether this mechanism operates in vivo, we examined the natural *Caenorhabditis elegans* mutant gas-1, whose abnormally high CII expression destabilizes CI (Pujol et al., 2013). The gas-1 mutants were highly sensitive to low-dose rotenone (Table S3), and 10 hr on this low dose significantly stabilized CI (Figure 6L).

DISCUSSION

Our results allow us to propose a molecular mechanism through which mitochondria reconfigure the mETC to adjust to the ratio of electron flux from NADH and FADH₂ (Figure 7). The function of CoQ redox status as a metabolic sensor enabling cells to adjust the amount of NADH dehydrogenase (CI) explains the structural dependency of CI on CIII and CIV and the variability of biochemical defects in patients with OXPHOS deficiencies in a single mETC component (Bruno et al., 2003; Lamantea et al., 2002). We also reveal a relationship between CII and CI, whereby CI is destabilized not only by CIII or CIV deficiency but also by activation of CII. In all cases, CoQH₂ accumulation triggers RET (Figure 7A), causing localized damage to CI components and disassembly of the complex until it reaches the appropriate level. Thus, less CIII is dedicated to CI+CIII SCs, potentiating oxidation of CoQH₂ generated by FAD-dependent enzymes. This mechanism links CoQ redox status to the recently described role of the SC organization of mitochondrial respiratory complexes (Lapiente-Brun et al., 2013) and adds a second route for SC regulation in addition to the remodeling of cristae shape (Cogliati et al., 2013).

The loss of CI upon excess expression of CII in *C. elegans* (Pujol et al., 2013) and its reversal by CII downregulation (Pujol et al., 2013) or rotenone treatment (as discussed in this article) extend the relevance of CoQ redox status in ETC remodeling to distant metazoans. Moreover, AOX, which restores CI by oxidizing CoQH₂, is proposed to contribute to the assembly or stability of fungal CI (in *Podospora anserina* mutants, in which respiration relies exclusively on AOX due to the lack of CIII and CIV [Krause et al., 2004; Maas et al., 2009], and in other microorganisms, including *Yarrowia lipolytica* [Guerrero-Castillo et al., 2009] and

(H) Flow cytometry analysis of ROS production 24 hr after fuel shift in the presence or absence of rotenone. Data are mean ± SD; n = 9.

(I) Top: flow cytometry analysis of ROS production in Cb cells treated with xanthine oxidase + xanthine (XO) to generate H₂O₂; nitropropionic acid (NPA) was added as a CII inhibitor. Bottom: effect of H₂O₂ on CII and CI activities in control cells (Cb) upon CII inhibition (+NPA), CII stimulation (+XO), or simultaneous treatment with NPA and XO. Data are normalized to citrate synthase activity (CS). Data are represented as a boxplot; n ≥ 4.

(J) BNGE of digitonin-solubilized mitochondrial proteins from control cells (C₀) cultured in the presence of the indicated drugs, illustrating adjustment in the relative amounts of CI and CII. The blot shows immunodetection of CI (anti-NDUFA9), CII (anti-FpSDH), and Tom20 as a loading control; positions of complexes and superassemblies are indicated on the left.

(K) Quantification of changes in CI and CII content shown in (J).

(L) BNGE of mitochondrial preparations from two *C. elegans* strains: control (Wt) and the natural CII-overexpressing mutant gas-1. Superassembly of CI is impaired in gas-1 worms, but the normal pattern of CI SCs is restored upon in vivo RET blockade with rotenone.

Statistical differences were assessed by ANOVA Tukey's multiple comparisons test. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; ****p < 0.0001.

Neurospora crassa [Duarte and Videira, 2009]); however, no explanation has been offered of how AOX might achieve this. AOX-mediated prevention of increase in CoQH₂, as detected here in mammalian mitochondria, provides a convincing explanation, suggesting that this mechanism operates in fungi and is, therefore, very ancient.

Our proteomics analysis reveals oxidative alterations in a defined CI region: the NADH dehydrogenase and hydrogenase modules. Subunits of these modules are degraded faster than most other CI subunits, with NDUFV1 and NDUFS1 appearing to be the most sensitive components. The cysteines monitored in these two proteins participate in the linking of iron-sulfur clusters or are solvent accessible; therefore, their oxidation may cause loss of the cluster. Interestingly, these CI subunits are the most sensitive to the knockdown of the iron-sulfur cluster assembly factor Ind1, whereas proteins of the CI membrane arm are less affected (Sheftel et al., 2009). In agreement with this view, independent reports showed that the subunits from NADH module can be replaced in pre-existing CI and are more rapidly turned over than other CI subunits (Dieteren et al., 2012; Lazarou et al., 2007).

CI is believed to be a major site of ROS production in the mETC, either from FAD- or NAD-driven electron flux (Murphy, 2009). NADH feeds electrons to CI via forward electron transfer (FET), and this can lead to ROS production when downstream electron flux is inhibited, for example, by rotenone (Murphy, 2009; Ten and Starkov, 2012). However, under specific conditions, these electrons can flux back to CI through CoQH₂ via RET. It is notable that RET, but not FET, promotes CI degradation. The reason for this is unclear and just may be due to the fact that RET induces much more ROS than FET, or it may suggest that the manner of electron flux within CI may be relevant to the proposed regulatory role of CoQ redox status.

RET has been demonstrated in isolated mitochondria (Murphy, 2009; Ten and Starkov, 2012), and its physiological role in vivo has been highlighted recently by the description of its major contribution to cardiac ischemia/reperfusion injury associated with myocardial infarction (Chouchani et al., 2014). Here, we extend ideas of RET function beyond pathology to a fundamental physiological role as a mechanism that fine-tunes mitochondrial OXPHOS to the available carbon source.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell Lines and Media

All cell lines were grown in DMEM (D5796 Sigma-Aldrich) supplemented with 5% FBS (fetal bovine serum, Gibco-BRL) and 1 mM sodium pyruvate (Lonza) in a 5% CO₂, 95% air atmosphere at 37°C. Cell lines lacking a mitochondrial complex were supplemented with 50 µg/ml uridine. The different cell lines used in this study were generated and described previously: *mt-CYTb* mutant lacking CIII, called Cytb^{KO} here and A22 in a previous report (Acín-Pérez et al., 2004); the COX10^{KO} cell line, lacking CIV (Diaz et al., 2006); and Cytc^{KO} cells (Vempati et al., 2009). For hypoxic exposure, cells were placed in a modular incubator chamber (Ruskinn) that was flushed with 1% O₂/5% CO₂/balance N₂. For drug treatment, medium containing the indicated concentration of rotenone, antimycin A (125 nM), or azide (1 mM) was changed daily, and cells were cultured for 48 hr. When indicated, cells were cultured for 24 hr in sugar-free DMEM (Sigma-Aldrich D5030) supplemented with 5% dialyzed FBS, 1 mM sodium pyruvate (Lonza), and 2 mM L-glutamine (Lonza) and further supplemented, as required, with 5 mM glucose, 5 mM galactose,

1 mg/ml lipid-rich bovine serum AlbuMAX (GIBCO) plus 0.5 mM L-carnitine hydrochloride (Sigma) or a mix of lithium acetoacetate (5 mM) plus DL-beta-hydroxybutyric acid sodium salt (5 mM).

Gene Constructs

The mouse codon-usage-optimized version of the *Aox* gene from *Emericella nidulans* was utilized as previously described (Perales-Clemente et al., 2008).

CoQ Determination

CoQ content and the ratio of the oxidized and reduced forms were measured as described previously (Brea-Calvo et al., 2006; Lagendijk et al., 1996).

Quantitative Real-Time PCR

Total RNA was extracted from 1 million of cells with TRIzol, followed by purification with a commercial kit (QIAGEN). Quantitative real-time PCR was performed with primers for Pdh3 (forward, 5'-TGGACAACCCCAATGGTGAT-3', reverse, 5'-GCAGGACCCCTCCATGTAAC-3') and Pdk1 (forward, 5'-AGCA GTTCTCTGGACTTCG-3', reverse 5'-CTCCTGAAGGCTTTGGATATACC-3').

Mitochondrial Proteomics by Data-Independent Scanning Mass Spectrometry

Mitochondrial cysteine-thiol redox status was studied using the GELSILOX method (Martínez-Acedo et al., 2012). 1% false discovery rate (FDR) was used as a criterion for peptide identification; this parameter was estimated using a separate inverted database (Navarro and Vázquez, 2009). After protein digestion with trypsin, the resulting peptide mixtures were analyzed by data-independent scanning (DiS) onto a Q-Exactive mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific). Each sample was analyzed in two chromatographic runs covering different mass ranges (from 400 to 750 Da and from 750 to 1,100 Da, respectively). The DiS cycle consisted of 175 sequential HCD MS/MS (higher energy C-trap dissociation/tandem mass spectrometry) fragmentation events with 2-Da windows. Semiquantitative monitoring of identified peptides was performed in the MS/MS spectra using Sequest's SpScore. 1% FDR was used as a criterion for peptide identification; this parameter was estimated using a separate inverted database (Navarro and Vázquez, 2009). Detailed description of the proteomic analysis can be found in the Supplemental Information.

Quantitative Analysis of Mitochondrial Proteins

After in-gel trypsin digestion, all the reoxygenation samples were equally mixed with a control sample (hypoxia) labeled with ¹⁸O. Peptide quantification from FullScan spectra and labeling efficiency calculation were performed as described previously (López-Ferrer et al., 2006; Ramos-Fernández et al., 2007).

Lentiviral Vector Production and Transduction of Cell Lines

Lentiviral vectors were generated as described previously (Naldini et al., 1996). Cells at 80% confluence were transduced with lentiviral particles carrying the *Aox* or *SOD2* gene. Cells expressing the protein of interest were isolated by puromycin selection.

BN Electrophoresis and In-Gel Activity Assay

Mitochondria were isolated and analyzed by BNGE, according to Wittig et al. (2006), with some modifications (Acín-Pérez et al., 2008). SDS-PAGE was conducted with strips excised from the first-dimension BNGE (Wittig et al., 2006).

Western Blotting

After electrophoresis (SDS-PAGE, BNGE, or BN-SDS-PAGE), gels were electroblotted onto Hybond-P polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (GE Healthcare) and sequentially probed with specific antibodies against CI components (anti-NDUFA9 from MitoSciences; anti-NDUFB6 from Molecular Probes; and anti-NDUFA8, anti-NDUFB7, and anti-NDUFS5 from Protein Tech), CII (anti-70 kDa subunit from Molecular Probes), CIII (anti-Core2 from MitoSciences), CIV (anti-COI from MitoSciences), VDAC1 (MitoSciences), Tom 20 (Santa Cruz Biotechnology), AOX-HA (anti-hemagglutinin [anti-HA] from Roche), and SOD2 (Abcam). Secondary antibodies were peroxidase conjugated (Invitrogen) when the signal was generated using ECL Plus (GE

Healthcare) or conjugated to LI-COR IRDye 800CW or IRDye 680LT when the signal was acquired with the ODYSSEY Infrared Imaging System (LI-COR). The relative amount of each band was estimated with GelEval software from the scanned membranes or with the ODYSSEY Infrared Imaging System (LI-COR). The traces obtained by vertical scan represent the density along the line.

Pulse Labeling of mtDNA-Encoded Subunits

Cysteine residues in mtDNA-encoded proteins were labeled in intact cells with [³⁵S]-methionine during a 2-hr pulse followed by a 12-hr chase, using the EXPRE³⁵S Protein Labeling Mix (PerkinElmer Life Sciences), as described elsewhere (Chomyn, 1996; Fernández-Silva et al., 2007).

Oxygen Consumption

Oxygen consumption was measured with an XF96 Extracellular Flux Analyzer (SeaHorse Bioscience), as specified by the provider. Data were normalized to DNA content with the CyQuant NF Cell Proliferation Assay Kit (Molecular Probes). Oxygen consumption in digitonin-permeabilized cells was measured with an Oxytherm Clark-type electrode (Hansatech), as previously described (Bayona-Bafaluy et al., 2003).

Immunofluorescence

Cells were incubated for 20 min under culture conditions with 100 nM of the mitochondrial dye MitoTracker Red (Molecular Probes). Cells were fixed with 4% paraformaldehyde and permeabilized with cold methanol. After blocking with 2% BSA, cells were incubated with anti-HA antibody (Roche) and Alexa Fluor 488 secondary antibody (Molecular Probes).

Immunoprecipitation

CI was immunocaptured from digitonin-solubilized mitochondria with the MitoSciences CI Immunocapture Kit.

Spectrophotometrical Measurements of OXPHOS Enzymes

Activities of citrate synthase and the combined activities of CII+CIII and CI+CIII were measured in cell homogenates as described previously (Birch-Machin and Turnbull, 2001).

Mouse Model of CI

Mouse CI matrix-exposed proteins were structurally aligned with the corresponding *Thermus thermophilus* homolog proteins by using the comparative modeling tool SWISS-MODEL (Bordoli and Schwede, 2012). Finally, using the Python Molecular Viewer (Sanner, 1999) we performed a manual docking of every matrix complex I protein based on the template from PDB: 2YBB of the fitted model for bovine mitochondrial SC (Althoff et al., 2011).

ROS Production and Measurement

Controlled production of ROS in cells was achieved by incubating cells for 6–8 hr in the presence of xanthine (100 μM) and xanthine oxidase (100 mU/ml). The CI inhibitor 3-nitropropionic acid (NPA) was used at 1 mM. All the reagents were purchased at Sigma-Aldrich. ROS production in control and treated fibroblasts was assessed by flow cytometry using 2,7-DCFH2-DA as the probe (Kamiński et al., 2012).

Nematode Strains and Analysis

Wild-type (*C. elegans*, N2, Bristol) and the gas-1(fc21) mutant were obtained from the Caenorhabditis Genetics Center, and growth was maintained in standard conditions (Stiernagle, 2006). Control and mutant worms were grown with 7 μM rotenone in nematode growth medium (NGM) plates (standard plates) for 10 hr at 20°C. After 10 hr, the gas-1 worms move slowly, and when the plates are very fresh, they begin to die. Wild-types (N2) looked and moved normally in these conditions (see Table S3). BNGE was performed as described previously (Pujol et al., 2013). Western blotting was performed using PVDF membranes and the iBlot system (Invitrogen). CI was detected with a 1:1,000 dilution of monoclonal anti-human NDUFS3 (the homolog of *C. elegans* NUO-2) (MS112, mouse, MitoSciences). CV was detected with a 1:1,000 dilution of monoclonal anti-ATP synthase subunit alpha (MS507, mouse, MitoSciences).

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes Supplemental Experimental Procedures, five figures, and three tables and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2016.03.009>.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Concepción Jiménez, Ana Latorre-Pellicer, Andrés González-Guerra, and Marta Roche for technical assistance and Simon Bartlett for English editing. This study was supported by grants from the Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2012-32776, BIO2012/37926, and CSD2007-00020), the Comunidad de Madrid (CAM/S2010), the EU (UE0/GA317433 and UE0/MCA1201), and the Instituto de Salud Carlos III (FIS grants PI14-01962 and PI12-01297, Redes-RD12/0042/0056, and ProteoRed-PT13/0001/0017). A.G. is the recipient of an FPI fellowship (MIN/FPI1009). C.T.M. and F.D. were supported by the NIH (grants 1R01NS079965, 1R01AG036871, and 1R01GM101225, respectively). The CNIC is supported by the Ministerio de Economía y Competitividad and the Pro-CNIC Foundation.

Received: August 27, 2015

Revised: February 3, 2016

Accepted: February 27, 2016

Published: March 24, 2016

REFERENCES

- Acín-Pérez, R., Bayona-Bafaluy, M.P., Fernández-Silva, P., Moreno-Loshuertos, R., Pérez-Martos, A., Bruno, C., Moraes, C.T., and Enriquez, J.A. (2004). Respiratory complex III is required to maintain complex I in mammalian mitochondria. *Mol. Cell* 13, 805–815.
- Acín-Pérez, R., Fernández-Silva, P., Peleato, M.L., Pérez-Martos, A., and Enriquez, J.A. (2008). Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Mol. Cell* 32, 529–539.
- Acín-Pérez, R., Carrascosa, I., Baixauli, F., Roche-Molina, M., Latorre-Pellicer, A., Fernández-Silva, P., Mittelbrunn, M., Sánchez-Madrid, F., Pérez-Martos, A., Lowell, C.A., et al. (2014). ROS-triggered phosphorylation of complex II by Fgr kinase regulates cellular adaptation to fuel use. *Cell Metab.* 19, 1020–1033.
- Althoff, T., Mills, D.J., Popot, J.-L., and Kühlbrandt, W. (2011). Arrangement of electron transport chain components in bovine mitochondrial supercomplex I1III2IV1. *EMBO J.* 30, 4652–4664.
- Baradaran, R., Berrisford, J.M., Minhas, G.S., and Sazanov, L.A. (2013). Crystal structure of the entire respiratory complex I. *Nature* 494, 443–448.
- Bayona-Bafaluy, M.P., Manfredi, G., and Moraes, C.T. (2003). A chemical enucleation method for the transfer of mitochondrial DNA to rho(0) cells. *Nucleic Acids Res.* 31, e98.
- Birch-Machin, M.A., and Turnbull, D.M. (2001). Assaying mitochondrial respiratory complex activity in mitochondria isolated from human cells and tissues. *Methods Cell Biol.* 65, 97–117.
- Bordoli, L., and Schwede, T. (2012). Automated protein structure modeling with SWISS-MODEL Workspace and the Protein Model Portal. *Methods Mol. Biol.* 857, 107–136.
- Brea-Calvo, G., Rodríguez-Hernández, A., Fernández-Ayala, D.J.M., Navas, P., and Sánchez-Alcázar, J.A. (2006). Chemotherapy induces an increase in coenzyme Q10 levels in cancer cell lines. *Free Radic. Biol. Med.* 40, 1293–1302.
- Bruno, C., Santorelli, F.M., Assereto, S., Tonoli, E., Tessa, A., Traverso, M., Scapolan, S., Bado, M., Tedeschi, S., and Minetti, C. (2003). Progressive exercise intolerance associated with a new muscle-restricted nonsense mutation (G142X) in the mitochondrial cytochrome b gene. *Muscle Nerve* 28, 508–511.
- Chomyn, A. (1996). In vivo labeling and analysis of human mitochondrial translation products. *Methods Enzymol.* 264, 197–211.

- Chouchani, E.T., Pell, V.R., Gaude, E., Aksentijević, D., Sundier, S.Y., Robb, E.L., Logan, A., Nadtochiy, S.M., Ord, E.N.J., Smith, A.C., et al. (2014). Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature* 515, 431–435.
- Cogliati, S., Frezza, C., Soriano, M.E., Varanita, T., Quintana-Cabrera, R., Corrado, M., Cipolat, S., Costa, V., Casarin, A., Gomes, L.C., et al. (2013). Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency. *Cell* 155, 160–171.
- Danielson, S.R., Held, J.M., Oo, M., Riley, R., Gibson, B.W., and Andersen, J.K. (2011). Quantitative mapping of reversible mitochondrial Complex I cysteine oxidation in a Parkinson disease mouse model. *J. Biol. Chem.* 286, 7601–7608.
- Diaz, F., Fukui, H., Garcia, S., and Moraes, C.T. (2006). Cytochrome c oxidase is required for the assembly/stability of respiratory complex I in mouse fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* 26, 4872–4881.
- Dieteren, C.E.J., Koopman, W.J.H., Swarts, H.G., Peters, J.G.P., Maczuga, P., van Gemst, J.J., Masereeuw, R., Smeitink, J.A.M., Nijtmans, L.G.J., and Willems, P.H.G.M. (2012). Subunit-specific incorporation efficiency and kinetics in mitochondrial complex I homeostasis. *J. Biol. Chem.* 287, 41851–41860.
- Duarte, M., and Videira, A. (2009). Effects of mitochondrial complex III disruption in the respiratory chain of *Neurospora crassa*. *Mol. Microbiol.* 72, 246–258.
- Efremov, R.G., Baradaran, R., and Sazanov, L.A. (2010). The architecture of respiratory complex I. *Nature* 465, 441–445.
- Enríquez, J.A. (2016). Supramolecular organization of respiratory complexes. *Annu. Rev. Physiol.* 78, 533–561.
- Fernández-Silva, P., Acín-Pérez, R., Fernández-Vizcarra, E., Pérez-Martos, A., and Enríquez, J.A. (2007). In vivo and in organello analyses of mitochondrial translation. *Methods Cell Biol.* 80, 571–588.
- Galkin, A., Meyer, B., Wittig, I., Karas, M., Schagger, H., Vinogradov, A., and Brandt, U. (2008). Identification of the mitochondrial ND3 subunit as a structural component involved in the active/deactive enzyme transition of respiratory complex I. *J. Biol. Chem.* 283, 20907–20913.
- Galkin, A., Abramov, A.Y., Frakich, N., Duchon, M.R., and Moncada, S. (2009). Lack of oxygen deactivates mitochondrial complex I: implications for ischemic injury? *J. Biol. Chem.* 284, 36055–36061.
- Guerrero-Castillo, S., Vázquez-Acevedo, M., González-Halphen, D., and Uribe-Carvajal, S. (2009). In *Yarrowia lipolytica* mitochondria, the alternative NADH dehydrogenase interacts specifically with the cytochrome complexes of the classic respiratory pathway. *Biochim. Biophys. Acta* 1787, 75–85.
- Hernández-Agustín, P., Izquierdo-Álvarez, A., Sánchez-Gómez, F.J., Ramos, E., Villa-Piña, T., Lamas, S., Bogdanova, A., and Martínez-Ruiz, A. (2014). Acute hypoxia produces a superoxide burst in cells. *Free Radic. Biol. Med.* 71, 146–156.
- Hirst, J. (2013). Mitochondrial complex I. *Annu. Rev. Biochem.* 82, 551–575.
- Hofhaus, G., and Attardi, G. (1995). Efficient selection and characterization of mutants of a human cell line which are defective in mitochondrial DNA-encoded subunits of respiratory NADH dehydrogenase. *Mol. Cell. Biol.* 15, 964–974.
- Kamiński, M.M., Sauer, S.W., Kamiński, M., Opp, S., Ruppert, T., Grigaravičius, P., Grudnik, P., Gröne, H.-J., Krammer, P.H., and Gülow, K. (2012). T cell activation is driven by an ADP-dependent glucokinase linking enhanced glycolysis with mitochondrial reactive oxygen species generation. *Cell Rep.* 2, 1300–1315.
- Koh, M.Y., and Powis, G. (2012). Passing the baton: the HIF switch. *Trends Biochem. Sci.* 37, 364–372.
- Krause, F., Scheckhuber, C.Q., Werner, A., Rexroth, S., Reifschneider, N.H., Dencher, N.A., and Osiewacz, H.D. (2004). Supramolecular organization of cytochrome c oxidase- and alternative oxidase-dependent respiratory chains in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *J. Biol. Chem.* 279, 26453–26461.
- Legendijk, J., Ubbink, J.B., and Vermaak, W.J. (1996). Measurement of the ratio between the reduced and oxidized forms of coenzyme Q10 in human plasma as a possible marker of oxidative stress. *J. Lipid Res.* 37, 67–75.
- Lamantea, E., Carrara, F., Mariotti, C., Morandi, L., Tiranti, V., and Zeviani, M. (2002). A novel nonsense mutation (Q352X) in the mitochondrial cytochrome b gene associated with a combined deficiency of complexes I and III. *Neuromuscul. Disord.* 12, 49–52.
- Lapiente-Brun, E., Moreno-Loshuertos, R., Acín-Pérez, R., Latorre-Pellicer, A., Colás, C., Balsa, E., Perales-Clemente, E., Quirós, P.M., Calvo, E., Rodríguez-Hernández, M.A., et al. (2013). Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain. *Science* 340, 1567–1570.
- Lazarou, M., McKenzie, M., Ohtake, A., Thorburn, D.R., and Ryan, M.T. (2007). Analysis of the assembly profiles for mitochondrial- and nuclear-DNA-encoded subunits into complex I. *Mol. Cell. Biol.* 27, 4228–4237.
- López-Ferrer, D., Ramos-Fernández, A., Martínez-Bartolomé, S., García-Ruiz, P., and Vázquez, J. (2006). Quantitative proteomics using 16O/18O labeling and linear ion trap mass spectrometry. *Proteomics* 6 (Suppl 1), S4–S11.
- Maas, M.F.P.M., Krause, F., Dencher, N.A., and Sainsard-Chanet, A. (2009). Respiratory complexes III and IV are not essential for the assembly/stability of complex I in fungi. *J. Mol. Biol.* 387, 259–269.
- Martínez-Acedo, P., Núñez, E., Gómez, F.J.S., Moreno, M., Ramos, E., Izquierdo-Álvarez, A., Miró-Casas, E., Mesa, R., Rodríguez, P., Martínez-Ruiz, A., et al. (2012). A novel strategy for global analysis of the dynamic thiol redox proteome. *Mol. Cell. Proteomics* 11, 800–813.
- Murphy, M.P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* 417, 1–13.
- Naldini, L., Blömer, U., Gage, F.H., Trono, D., and Verma, I.M. (1996). Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 11382–11388.
- Nath, A.K., Ryu, J.H., Jin, Y.N., Roberts, L.D., Dejam, A., Gerszten, R.E., and Peterson, R.T. (2015). PTPMT1 inhibition lowers glucose through succinate dehydrogenase phosphorylation. *Cell Rep.* 10, 694–701.
- Navarro, P., and Vázquez, J. (2009). A refined method to calculate false discovery rates for peptide identification using decoy databases. *J. Proteome Res.* 8, 1792–1796.
- Pagliarini, D.J., Calvo, S.E., Chang, B., Sheth, S.A., Vafai, S.B., Ong, S.-E., Walford, G.A., Sugiana, C., Boneh, A., Chen, W.K., et al. (2008). A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. *Cell* 134, 112–123.
- Perales-Clemente, E., Bayona-Bafaluy, M.P., Pérez-Martos, A., Barrientos, A., Fernández-Silva, P., and Enríquez, J.A. (2008). Restoration of electron transport without proton pumping in mammalian mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 18735–18739.
- Pujol, C., Bratić-Hench, I., Sumakovic, M., Hench, J., Mourier, A., Baumann, L., Pavlenko, V., and Trifunovic, A. (2013). Succinate dehydrogenase upregulation destabilize complex I and limits the lifespan of gas-1 mutant. *PLoS ONE* 8, e59493.
- Ramos-Fernández, A., López-Ferrer, D., and Vázquez, J. (2007). Improved method for differential expression proteomics using trypsin-catalyzed 18O labeling with a correction for labeling efficiency. *Mol. Cell. Proteomics* 6, 1274–1286.
- Sanner, M.F. (1999). Python: a programming language for software integration and development. *J. Mol. Graph. Model.* 17, 57–61.
- Schagger, H., and Pfeiffer, K. (2000). Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J.* 19, 1777–1783.
- Sheftel, A.D., Stehling, O., Pierik, A.J., Netz, D.J.A., Kerscher, S., Elsässer, H.-P., Wittig, I., Balk, J., Brandt, U., and Lill, R. (2009). Human ind1, an iron-sulfur cluster assembly factor for respiratory complex I. *Mol. Cell. Biol.* 29, 6059–6073.
- Speijer, D. (2011). Oxygen radicals shaping evolution: why fatty acid catabolism leads to peroxisomes while neurons do without it: FADH₂/NADH flux ratios determining mitochondrial radical formation were crucial for the eukaryotic invention of peroxisomes and catabolic tissue differentiation. *BioEssays* 33, 88–94.

- Stiernagle, T. (2006). Maintenance of *C. elegans*. *WormBook* 11, 1–11.
- Szklarczyk, R., Wanschers, B.F.J., Nabuurs, S.B., Nouws, J., Nijtmans, L.G., and Huynen, M.A. (2011). NDUF7 and NDUF8 are located at the intermembrane surface of complex I. *FEBS Lett.* 585, 737–743.
- Ten, V.S., and Starkov, A. (2012). Hypoxic-ischemic injury in the developing brain: the role of reactive oxygen species originating in mitochondria. *Neurol. Res. Int.* 2012, 542976.
- Vempati, U.D., Han, X., and Moraes, C.T. (2009). Lack of cytochrome c in mouse fibroblasts disrupts assembly/stability of respiratory complexes I and IV. *J. Biol. Chem.* 284, 4383–4391.
- Vinothkumar, K.R., Zhu, J., and Hirst, J. (2014). Architecture of mammalian respiratory complex I. *Nature* 515, 80–84.
- Wittig, I., Braun, H.-P., and Schägger, H. (2006). Blue native PAGE. *Nat. Protoc.* 1, 418–428.

Cell Reports, Volume 15

Supplemental Information

**The CoQH2/CoQ Ratio Serves as a Sensor
of Respiratory Chain Efficiency**

Adela Guarás, Ester Perales-Clemente, Enrique Calvo, Rebeca Acín-Pérez, Marta Loureiro-Lopez, Claire Pujol, Isabel Martínez-Carrascoso, Estefanía Nuñez, Fernando García-Marqués, María Angeles Rodríguez-Hernández, Ana Cortés, Francisca Diaz, Acisclo Pérez-Martos, Carlos T. Moraes, Patricio Fernández-Silva, Aleksandra Trifunovic, Plácido Navas, Jesús Vazquez, and Jose A. Enríquez

SUPPLEMENTARY MATERIAL FOR:
**The CoQH2/CoQ ratio serves as a sensor of respiratory chain
 efficiency**

Adela Guarás¹, Ester Perales-Clemente¹, Enrique Calvo², Rebeca Acín-Pérez¹, Marta Loureiro-López², Claire Pujol³, Isabel Martínez-Carrascoso¹, Estefanía Nuñez², Fernando García-Marqués², M. A. Rodríguez-Hernández⁴, Ana Cortés, Francisca Díaz⁵, Acisclo Pérez-Martos⁷, Carlos T. Moraes^{5,6}, Patricio Fernández-Silva⁷, Aleksandra Trifunovic³, Plácido Navas⁴, Jesús Vazquez² and J.A. Enríquez^{1,7*}

INVENTORY:

1.- Detailed description of the proteomic methodology:

2.- Supplementary Tables:

- **Table S1.** Total amount of CoQ (red + ox) in the different cell lines used in this study. Related to figure 1
- **Table S2.** Oxidative changes to complex I cysteines observed in in two models of oxidative stress. Related to Figure 5.
- **Table S3.** Response of the gas-1 *C. elegans* mutant to rotenone. Related to Figure 6.

3.- Supplementary Figures:

- **Supplementary Figure 1.-** AOX does not interact physically with CI. Related to Figure 1.
- **Supplementary Figure 2.** Detailed Effect of AOX on CI Subunits. Related to Figure 2.
- **Supplementary Figure 3.-** Complex I stabilization in Cox10^{KO} cells is HIF-1 α -independent. Related to Figure 4.
- **Supplementary Figure 4.** GELSILOX-targeted proteomics. Related to Figure 5.
- **Supplementary Figure 5.** Physiological relevance of RET. Related to Figure 6.

Detailed description of the proteomic methodology:

Mitochondrial proteomics by data-independent scanning (DiS) mass spectrometry.

Mitochondrial Cys-thiol redox status was studied by the GELSILOX method (Martínez-Acedo et al., 2012). The resulting tryptic peptide mixtures were subjected to nano-liquid chromatography coupled to mass spectrometry using a data-independent scanning (DiS) method. Peptides were injected onto a C-18 reversed phase (RP) nano-column (75 mm I.D. and 50 cm, Acclaim PepMap, Thermo Fisher, San José, CA, USA) and analyzed in a continuous acetonitrile gradient consisting of 8-31% B for 130 min, 50-90% B for 1 min (B=0.5% formic acid in acetonitrile). Peptides were eluted from the RP nano-column at a flow rate of ~200 nL/min to an emitter nanospray needle for real-time ionization and peptide fragmentation in a Q-Exactive mass spectrometer (Thermo Fisher). Each sample was analyzed in two chromatographic runs covering different mass ranges (from 400 to 750 Da and from 750 to 1100 Da). The DiS cycle consisted of 175 sequential HCD MS/MS fragmentation events with 2 Da-windows that covered each whole 350 Da-range. HCD fragmentation was performed at a resolution of 17,500 and a maximum injection time of 80 ms with the AGC set to a target of 3×10^5 ions. The whole cycle lasted 30 seconds or less depending on ion intensity during chromatography. The narrow windows used for fragmentation allowed peptide identification using conventional shotgun searching algorithms. This was done using Sequest running under Proteome Discoverer 1.4.0.288 (Thermo Fisher Scientific), allowing two missed cleavages, and using 2 Da and 10 ppm precursor and fragment mass tolerances, respectively. Met oxidation and Cys carbamydomethylation or methylthiolation were selected as dynamic modifications. 1% FDR was used as a criterion for peptide identification; this parameter was estimated using a separate inverted database (Navarro and Vázquez, 2009). Semiquantitative monitorization of identified peptides was performed in the MS/MS spectra using Sequest's SpScore.

Quantitative analysis of mitochondrial proteins. After in-gel trypsin digestion, all the reoxygenation samples were equally mixed with a control sample (hypoxia) labeled with ^{18}O . Peptide quantification from FullScan spectra and labeling efficiency calculation were performed as described (López-Ferrer et al., 2006; Ramos-Fernández et al., 2007), using QuiXoT, a program written in C# in our laboratory. Data statistical analysis was done on the basis of a recently developed and validated random-effects model that includes four different sources of variance: at the spectrum-fitting, scan, peptide and protein levels (Jorge et al., 2009). Briefly, the standardized variable zq describes the \log_2 ratio for each protein corrected for the corresponding systematical error, in each experiment.

Legends to supplementary figures:

Supplementary Figure 1.- AOX does not interact physically with complex I. Related to Figure 1. A, AOX expression and subcellular localization in CYTB^{KO}AOX, Cox10^{KO}AOX and CYTC^{KO}AOX cells. AOX was immunodetected with anti-HA and mitochondrial localization was confirmed by colocalization with MitoTracker red. **B,** Complex I was immunoprecipitated from digitonin-solubilized mitochondria of CYTB^{KO} cells and isogenic controls expressing AOX (CYTB^{KO}AOX and C57AOX). Lysates (not bound) and immunoprecipitates (IPCI) were probed with anti-NDUFB6 (complex I), anti-Fp (70 kDa complex II), anti-Core2 (complex III) and anti-COI (complex IV). VDAC, Tom20 and prohibitin were immunodetected as mitochondrial markers. AOX was detected with anti-HA (AOXHA). A long exposure of the AOX blot is shown on the left.

Supplementary Figure 2.- Detailed Effect of AOX on CI Subunits. Related to Figure 2. 1D and 2D blue-native electrophoresis of [³⁵S]-methionine pulse-labeled mtDNA-encoded proteins from control cells (C_B, C₁₀ & C_C), mutant cells (Cytb^{KO}, Cox10^{KO} & Cytc^{KO}) or mutant cells expressing AOX (Cytb^{KO}AOX, Cox10^{KO}AOX & Cytc^{KO}AOX). ND6, ND5, ND4, ND4L, ND3, ND2 and ND1 are subunits 1, 2, 3, 4, 5 and 6 of CI. COI, COII, and COIII are subunits 1, 2 and 3 of CIV. cyt b is the cytochrome b subunit of CIII. A6 and A8 are subunits of complex V.

Supplementary Figure 3.- Complex I stabilization in Cox10^{KO} cells is HIF-1α-independent. Related to Figure 4. **A**, Hypoxia does not alter the CoQH₂/CoQ ratio. Percentage of reduced CoQ in Cox10^{KO} cells grown in normoxia and after switching to 1% hypoxia. Data are means ± SD n=3. **B**, Quantitative RT-PCR analysis of mRNA expression of the known HIF-1α target genes prolyl hydroxylase domain protein 3 (*Phd3*) and pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme 1 (*Pdk1*) as positive controls for HIF-1α stabilization. Analysis was conducted in control cells (C₁₀) and mutant cells (Cox10^{KO}) grown at 21% O₂ or 1% O₂ and treated with vehicle (DMSO) or DMOG (0.5 mM) for 72 hours and after culture at 21% O₂ without treatment (n≥ 3, mean ± SEM; *p<0.05; Wilcoxon test). **C**, Blue native electrophoresis and western blot of digitonin-solubilized mitochondrial proteins from wild type cells (C₁₀) or cells lacking CIV (Cox10^{KO}) grown under different conditions.

Supplementary Figure 4.- GELSILOX-targeted proteomics. Related to Figure 5. **A**, Quantification of CI proteins as a proportion of total mitochondrial proteins (assembled and not assembled) assessed as the number of identified complex-I-derived peptides at each reoxygenation time, relative to hypoxia (no reoxygenation; 100%). **B**, ¹⁸O-labeling analysis of proteins belonging to complexes II to V during reoxygenation. **C**, Relative proportions of oxidized vs. reduced Cys-containing peptides identified in the total mitochondrial proteome (ALL) or in the indicated respiratory complex (CI, CII, CIII) obtained using the GELSILOX technique. **D**, Representative example of time monitoring of SpScores during chromatography runs for the GELSILOX-reacted Cys-containing peptide NACGSDYDFDVFFVR, from the complex I protein NDUFV1. **E**, Representative example of HCD fragmentation spectra for the oxidized and reduced species. Main fragments from the y-carboxy series are marked.

Supplementary Figure 5.- Physiological relevance of RET. Related to Figure 6. **A**, Densitometry traces of the electrophoretic bands in the gel shown in Figure 6A, illustrating the decrease in CI induced by the fuel shift from glucose to fatty acids but not to galactose. The decrease was evident in all three bands containing CI. These cells are unable to incorporate CIV into supercomplexes due to the lack of SCAFI (Lapiente-Brun et al., 2013). **B**, Densitometry traces of the electrophoretic bands in the gel shown in Figure 6B (SCAFI wild-type), illustrating the decrease in CI induced by the fuel shift from glucose to fatty acids, mainly affecting SCI+III^{SL} and SCI+III+IV. In this case the shift from glucose to galactose exerts the opposite effect, inducing a general increase in of CI in all bands. **C**, **D**, Box plot presenting the impact of Fgr tyrosine kinase ablation and SDHA Y604F mutation on H₂O₂-triggered CII and CI activities.

Supplementary Table 1. - Total amount of CoQ (red + ox) in the different cell lines used in this study.

Cell type	CoQ9 (pmol/mg prot)+SD
C_b	133.29±16 (n=6)
Cytb^{KO}	172.67±24 (n=6)
Cytb^{KO}+AOX	143.31±17 (n=6)
C₁₀	165.57± 21(n=5)
Cox10^{KO}	186.50±29 (n=5)
Cox10^{KO}+AOX	166.05±15 (n=5)
C_c	170.81±31 (n=3)
Cytc^{KO}	197.62± 35 (n=3)
Cytc^{KO}+AOX	176.07±23 (n=3)

Supplementary Table 2. - Oxidative changes observed in complex I cysteines in two models of oxidative stress

Cysteine	Peptide	<i>Thermus thermophilus</i>	Reoxygenation ^a		Glutathione depletion ^b		Potential role ^c
			Detected	Cys oxidation	Detected	Cys oxidation	
Ndufs1	75 LSVAGNeR	Nqo3-Cys45	Yes	No	Yes	No	I-S cluster
	78 McLVEIEK	Nqo3-Cys48	Yes	Yes	Yes	No	I-S cluster
	92 VVAAcAMPVMK	Nqo3-Cys83	Yes	Yes	Yes	Yes	I-S cluster
	176/179 cIQcTR	Nqo3-Cys181/184	Yes	No	No	-	I-S cluster
Ndufv1*	463 HSFeEVLK	Nqo3-Lys494	Yes	Yes	Yes	Yes	Unknown
	554 MLFLLGADGGcITR	Nqo3-Val571	Yes	Yes	Yes	No	Unknown
	125 YLVVNADGEGPGTcK	Nqo1-Phe101	Yes	Yes	Yes	No	Unknown
	142 LVEGcLVGGR	Nqo1-Met118	Yes	Yes	Yes	No	Unknown
Ndufs2	187 NAcGSDYDFDFVVR	Nqo1-Phe163	Yes	Yes	No	-	Unknown
	347 IIEQcLNK	Nqo4-Ala293	Yes	Yes	Yes	Yes	Unknown
	39 ANPYEcGFDPTSSAR	Nqo7-Ala39	Yes	Yes	Yes	No	CI activation

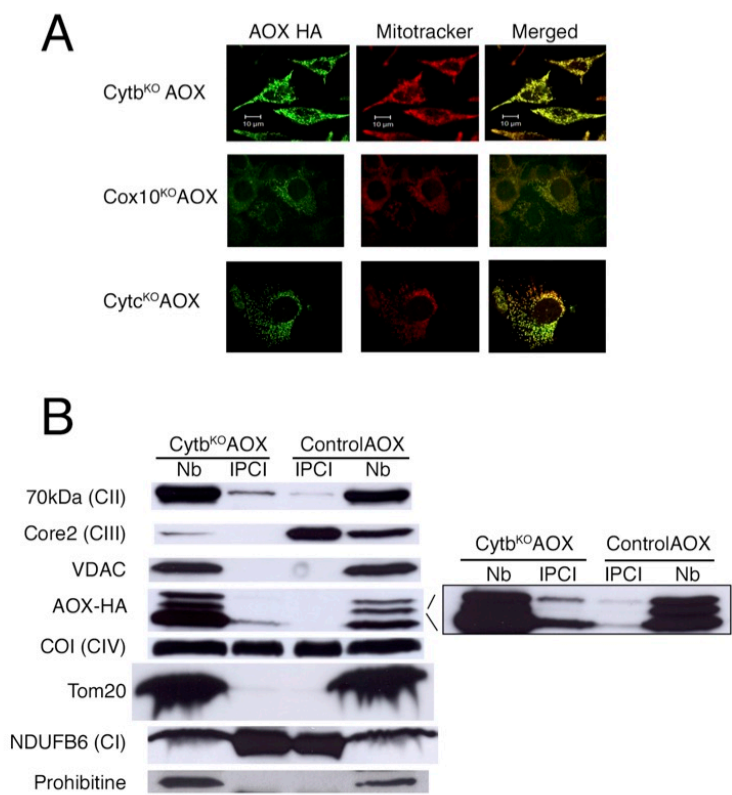
^aRe-oxygenation, data obtained in this report. ^bGlutathione depletion (Danielson et al., 2011). ^cThe potential role of each cysteine is inferred by homology with *Thermus thermophilus*. The sequences for alignment were obtained in Uniprot (Uniprot subunit ID: Ndufs1/Q91VD9, Ndufv1/Q91YT0, Ndufs2/Q91WD5, Nd3/P03899, Nqo3/Q56223, Nqo1/Q56222, Nqo4/Q56220, Nqo7/Q56217).

The table compares our analysis with a recent reported quantitative map of mitochondrial CI cysteine oxidation in brain mitochondria upon glutathione depletion (Danielson et al., 2011). This report showed that NDUFS1 (Cys⁹², Cys⁴⁶³ & Cys⁵⁵⁴) and NDUFS2 (Cys³⁴⁷) cysteines were among the more sensitive to oxidation. Notably two of these cysteines match those that we identified, and Cys⁹² in NDUFS1 belongs to the iron-sulfur cluster in which we detected Cys⁷⁵ and Cys⁷⁸. In agreement with our findings, the report showed that cysteines in NDUFB7 and NDUFA8 have a high basal level of oxidation, but contrary to our data, the reported glutathione depletion model did not detect significant alteration in the cysteine oxidation status of NDUFV1 (Danielson et al., 2011). This may indicate a fundamental difference in the mechanism of oxidative stress between the two models. Glutathione depletion reduces ROS scavenging capacity and would not increase ROS production by CI. RET would induce ROS production in CI. The fact that NDUFV1, the CI subunit that holds the flavin co-factor, appears to be very sensitive to oxidation in our conditions is also in agreement with the proposal that CI superoxide is produced by the reduction of the flavin in both forward electron transport (FET) and RET (Pryde and Hirst, 2011).

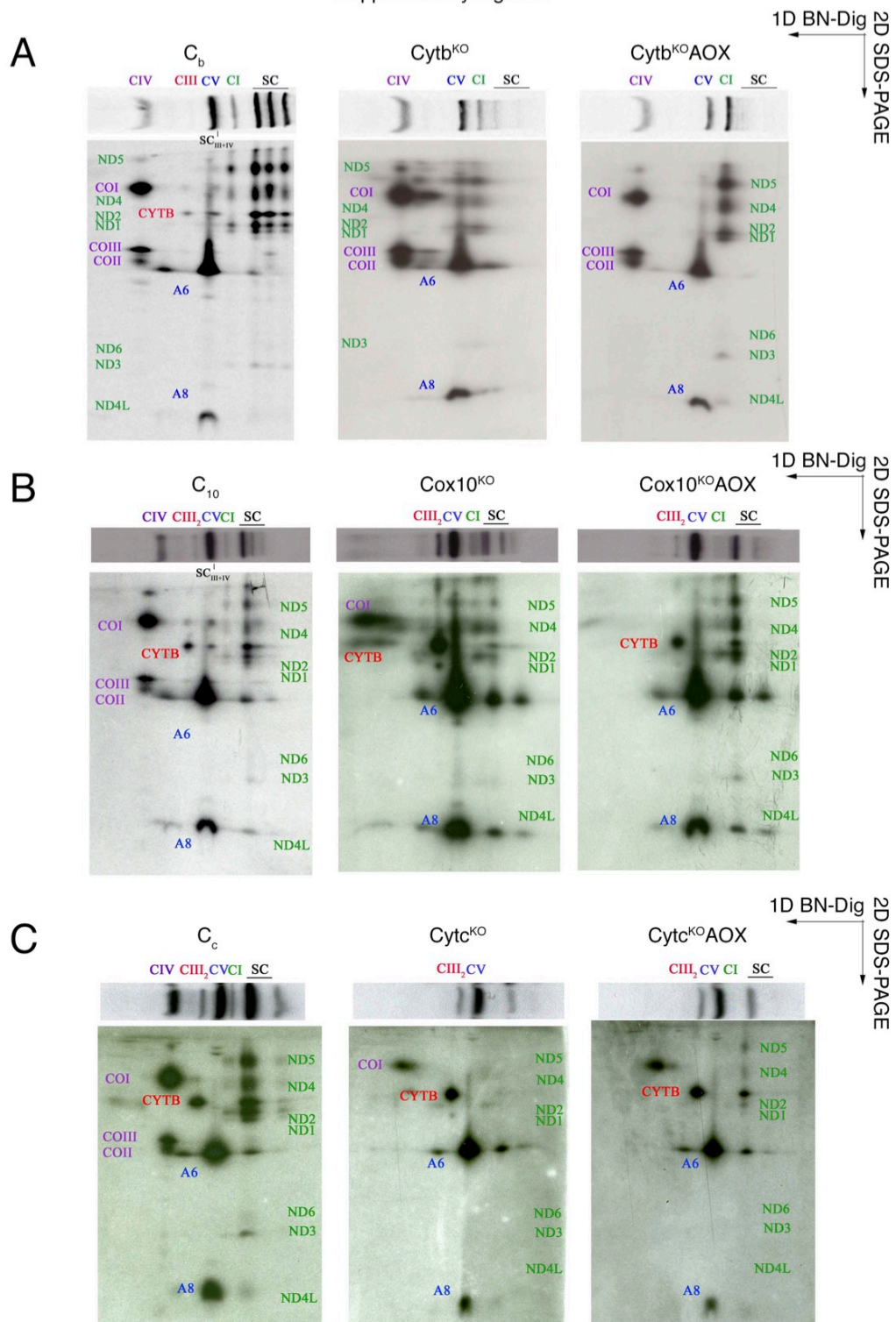
Supplementary Table 3.- Response of gas-1 *C. elegans* mutant to rotenone.

T ^a	Conc Rotenone	Time (hours)					
		0	5	7	10	12	24
20°C	25 µM	10	1	0	0	0	0
	10 µM	20	18	16	14	12	3
	5 µM	10	9	9	9	8	5
	1 µM	5	5	5	4	4	4
25°C	25 µM	10	0	0	0	0	0
	10 µM	20	17	15	12	8	3
	5 µM	10	10	7	6	6	1
	1 µM	5	5	5	5	5	4

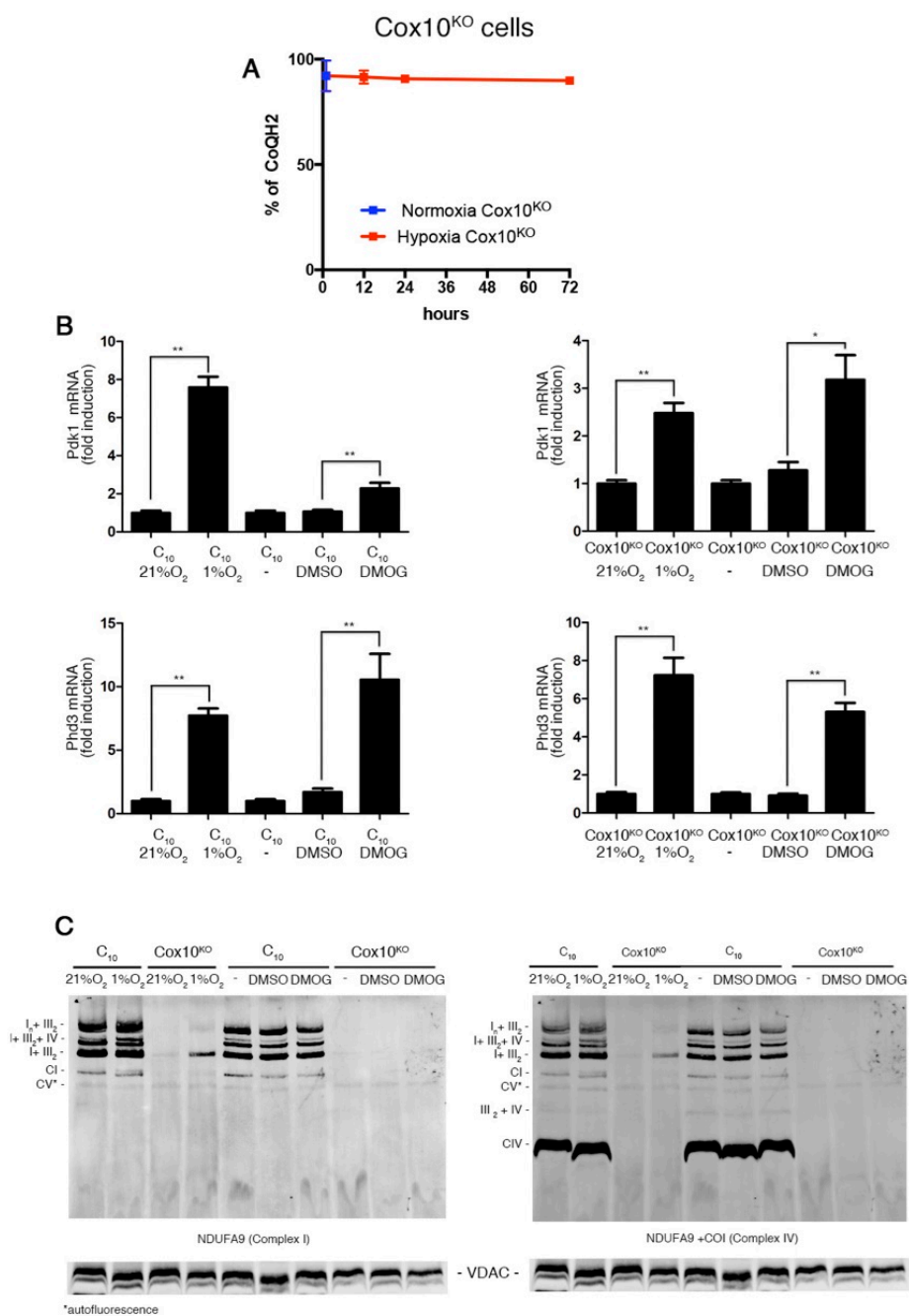
Figures indicate number of live gas-1 worms at the indicated rotenone doses and growing temperature. Wild-type worms were in all cases insensitive to the treatment.



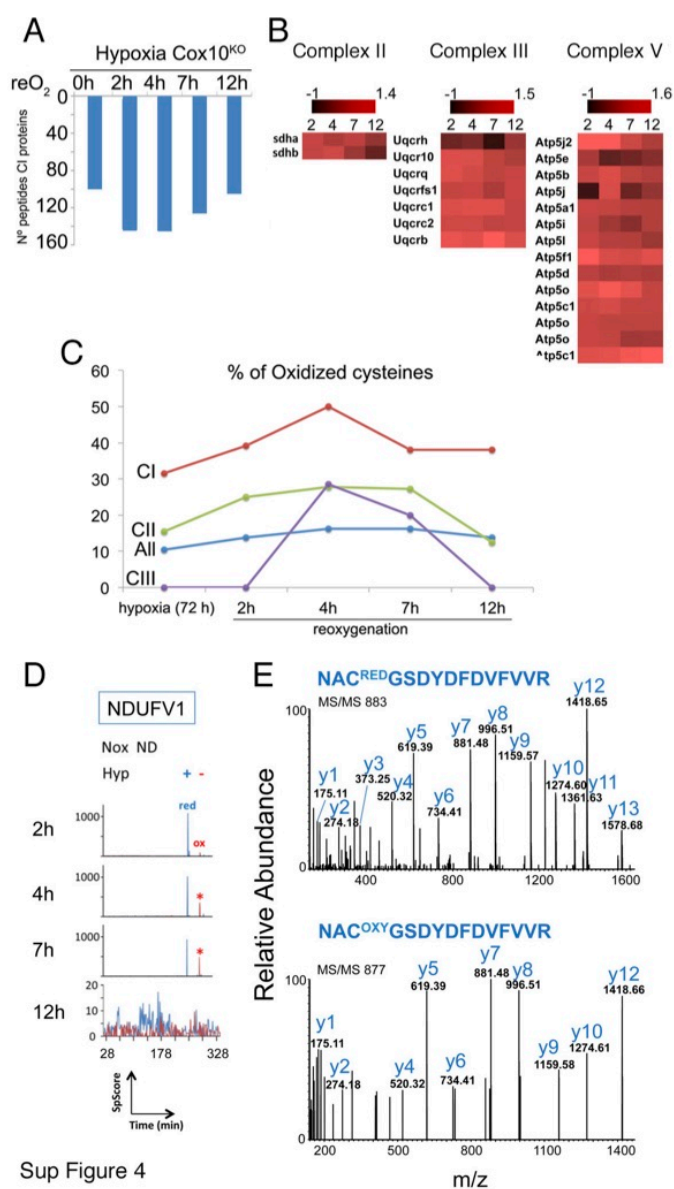
Supplementary Figure 2



Supplementary figure 3



Supplementary figure 4



Sup Figure 4

Supplementary figure 5

